

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460218

研究課題名(和文)5 還元酵素阻害剤の副作用による勃起障害と血管障害機構の解明

研究課題名(英文) The influence of 5-alpha-reductase inhibitors for erectile function and cardiovascular function

研究代表者

木村 和哲 (Kimura, Kazunori)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00423848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：2005年に男性型脱毛症治療薬のフィナステリド、2009年に前立腺肥大症治療薬のデュタステリドが承認された。これらの薬剤は5-還元酵素を阻害する薬剤であり、これまでの報告によると5-還元酵素阻害剤服用患者で勃起障害(ED)の副作用が見られたことを報告されている。EDと同様の機序で動脈硬化が進行することが知られており、本研究では5-還元酵素阻害剤による心血管機能への副作用を検討した。ラットにデュタステリドを連日投与したところ、4週後および8週後の時点でEDを発症した。一方、大動脈を用いて血管内皮機能を薬理的に評価したところいずれの期間においてもデュタステリド投与による変化は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：5-alpha-reductase inhibitors are used for Androgenetic Alopecia or benign prostatic hyperplasia from 2005. One study reported that 6 months of 5-alpha-reductase inhibitors therapy caused ED at 3 months and at 6 months. Erectile function have close relationship to cardiovascular function. We investigated the erectile function and cardiovascular function in animal model. 5-alpha-reductase inhibitors decreased the erectile function in rats at 4 weeks and 8 weeks. However, the endothelial function of the rats' aorta was not changed.

研究分野：臨床薬学

キーワード：5-還元酵素阻害剤 勃起障害 動脈硬化 血管内皮機能 ジヒドロテストステロン テストステロン  
酸化ストレス 一酸化窒素

### 1. 研究開始当初の背景

2005年に男性型脱毛症 (androgenic alopecia; AGA) 治療薬のフィナステリドが、2009年に前立腺肥大症治療薬のデュタステリドが承認された。本邦のAGA患者数は平成16年の調査で1,260万人、前立腺肥大症患者数は平成17年の調査で45万人に達し、今後も増加することが予想される。上述の薬剤は男性ホルモン的一种であるテストステロン (testosterone; TEST) がより活性の高いジヒドロテストステロン (dihydrotestosterone; DHT) へと変換する酵素の5-還元酵素を阻害する薬剤 (5- $\alpha$ -reductase inhibitor; 5ARI) である。5ARIはTEST量を増加させるので、男性性機能には影響を及ぼさないと考えられていた。

しかし、実際に5ARIの使用経験が報告されると、予想を上回る副作用の発現率が問題となった。国内臨床試験の報告において副作用発現がわずか3.2%であったのに対し、Zlottaらのグループは6か月間の使用した患者の38.6%で勃起障害 (erectile dysfunction; ED) の副作用が見られたと報告している。さらに2012年8月に行われた“World Meeting on Sexual Medicine 2012”でHartzellらのグループは、73%の患者でEDの副作用が見られたことを報告した。これら5ARIの副作用は投与中止後も継続することが報告されており、生活の質の著しい低下が懸念される。

また、5ARIとEDの基礎研究はHellstromらのグループによってこれまで2報のみ報告されている。彼らは5ARIをラットに投与し、EDが引き起こされ、さらに5ARIを投与し、休薬期間を設けてもEDは改善されなかったことを示した。その詳細なメカニズムは不明であるが、一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 産生の低下がEDの原因と考察している。NOは陰茎海綿体だけでなく、全身の血管平滑筋に作用するが、NO産生が低下すると動脈硬化を引き起こすことが知られている。陰茎の血管は冠動脈や脳動脈よりも細く、全身の血管障害が早期に出現するので、EDが全身の血管障害の初期症状と考えられている<sup>7)</sup>。それゆえ、5ARIによるNO産生の低下は陰茎以外の血管にも障害をおよぼし、心血管障害などの重大な副作用が数万人単位で起こるかもしれない。

申請者らはこれまで、動脈性EDに対する薬物治療や腎機能障害によるEDと血管機能の研究、男性ホルモン欠乏症に対するホルモン補充療法の研究等、血管系の障害やホルモンに関する研究を行い国内外で発表してきた。これまでの研究は本研究の基盤となるものであり、我々が研究を行い、5ARIによる副作用の病因を解明し、副作用を未然に防止する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、平滑筋の弛緩反応に関わる分子メカニズムに着目して、5ARIがラットの勃起機能および心血管機能におよぼす影響を検討し、5ARIによる副作用の病因を解明する。

本研究ではHellstromらのグループの報告でEDが明らかになった期間に加え、さらに長期間5ARIを投与した場合に勃起機能および心血管機能へ与える影響を、ラットの陰茎海綿体と大動脈を用いて比較検討することで心血管障害の副作用発現を調査する。

本研究を遂行するにあたり、DHT低下による勃起機能および心血管機能におよぼす影響が詳しくわかっていないという問題がある。これまでDHTの勃起機能への作用を検討した報告が2報あるが、全く正反対の結果となっており、DHTの勃起機能および心血管機能への作用メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、5ARIによる副作用の病因を解明する上で解決しなければならない課題である。

この問題を解決するため、本研究では“5ARIに加えてDHTを投与した群”を作成し、DHTが勃起機能におよぼす影響を検討する。“5ARIに加えてDHTを投与した群”で勃起機能が正常であれば、ED発症の原因がDHT低下によるが、勃起機能が低下していれば、5ARIそのものに薬剤性EDを発症させる原因があると判明する。我々は本研究で5ARIの副作用発現のメカニズムを解明すると同時に、DHTの勃起機能および心血管機能への作用メカニズムという命題も解決させる予定である。

### 3. 研究の方法

5ARIがどのようなメカニズムでEDを発症させるのか検討するため、まず5ARIの投与量と投与期間の検討を行う。これまでの報告では5ARIを0.5 mg/rat/dayの投与量で、4週間、および8週間投与していずれもEDを発症している。しかし、ヒトの投与量が0.5 mg/dayであり、体重あたり200倍近い投与量なので、非臨床試験の結果も考慮し、デュタステリドを500  $\mu$ g/kg/dayの投与量で設定し、投与期間に関しては心血管系への影響を考慮し、これまでの研究の4週、8週に加えて、さらに12週を設定し、長期間5ARIを摂取した場合の影響を検討する。対照群としてVehicleのみを投与するコントロール群を作成する。観察期間終了後、下記の項目を評価する。

#### (1) 起機能の評価:

陰茎海綿体内圧 (intracavernous pressure; ICP) 測定法を用いて勃起機能を *in vivo* で評価する。ICP測定法では麻酔下のラットの陰茎内の圧力をモニターし、海綿体神経を電気刺激することで勃起を誘発した時の圧力の変化から勃起機能の評価するもので、現在世界で広く用いられている方法である。

#### (2) 血管内皮機能の評価:

張力測定法を用いて陰茎海綿体および大動脈平滑筋の収縮・弛緩機能を評価する。このとき、陰茎海綿体と大動脈で障害の進行の程度を比較検討する。

(3) 組織学的評価：

摘出した大動脈から組織切片を作成し、HE 染色法により構造変化を観察した。さらに、Masson's trichrome 染色法を用いて平滑筋とコラーゲン繊維を染め分け、その割合を算出することで組織学的に勃起機能および血管機能を評価する。

(4) 分子生物学的評価：

摘出組織を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法を用いて、血管機能障害と関連する物質をゲノムレベルでの発現変動を検討する。

4. 研究成果

デュタステリド投与群とコントロール群において、体重に有意差は見られなかった。

(1) 起機能の評価：

ラットの勃起機能を ICP 測定法を用いて検討した。ICP 測定では ICP/MAP を用いて評価したところ、デュタステリド投与の 4 週後、および 8 週後のいずれの期間においても、ICP/MAP が有意に低下した ( $P < 0.01$ )。デュタステリド投与によりいずれの期間においてもラットの勃起機能が低下することが示唆された。

本研究ではデュタステリドの投与量を 500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定して行ったが、過去の Hellstrom らの報告と同様に、投与後 4 週の時点において勃起機能の低下が生じることが示唆された。また、投与期間を継続して 4 週間投与しても勃起機能の低下が継続していた。

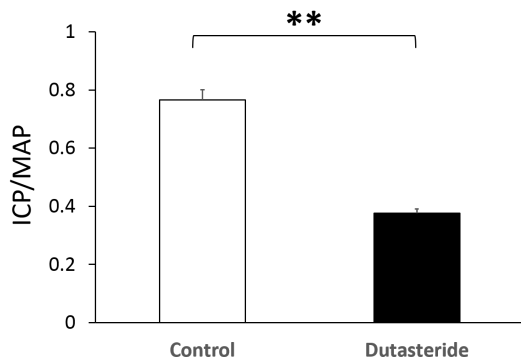


図 1. 4 週後における勃起機能評価の結果

(2) 血管内皮機能の評価：

ラットより摘出した大動脈を用いて張力測定法により、アセチルコリンに対する反応性を測定し、血管内皮機能を評価した。

デュタステリド投与の 4 週、8 週、12 週のいずれの時点においてもコントロール群とアセチルコリンに対する反応性に変化は見られず、血管内皮機能は正常であることが示唆された。

一方、NO ドナーである Sodium nitroprusside

(SNP) による反応性を検討したところ、いずれの期間においてもコントロール群とデュタステリド投与群の間で有意差は見られなかった。

以上の当尺性張力測定実験の結果から、デュタステリドを投与しても血管内皮機能及び平滑筋の弛緩機能には影響は見られない可能性が示唆された。

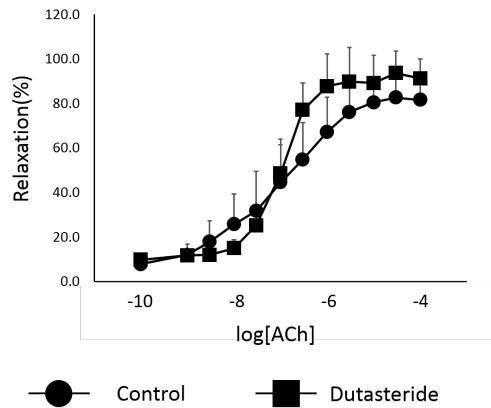


図 2. 8 週後の血管内皮機能評価の結果

(3) 組織学的評価：

ラットより摘出した大動脈を HE 染色法を用いて大動脈の構造変化を確認したところ、コントロール群とデュタステリド投与群の間で大きな変化は見られなかった。

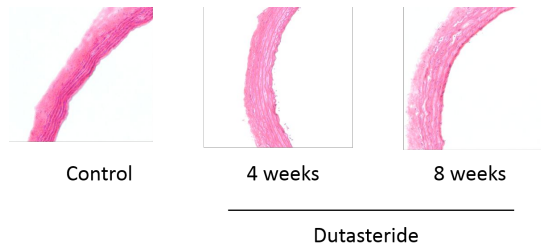


図 4. HE 染色の組織画像

一方、Masson's trichrome 染色法により平滑筋とコラーゲン繊維を染め分け、大動脈の繊維化や平滑筋の肥大化を検討した。Masson's trichrome 染色法では平滑筋が赤色に、コラーゲン繊維が、青色に染まる。これらの領域を検討してもコントロール群とデュタステリド投与群の間で大きな変化は見られなかった。

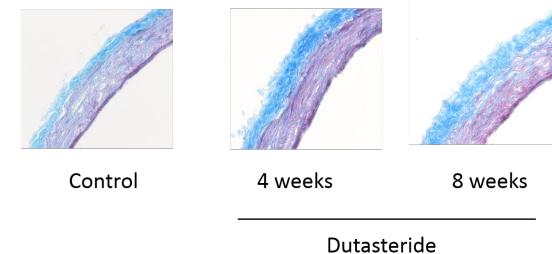


図 5. Masson's trichrome 染色の組織画像

#### (4) 分子生物学的評価：

##### 大動脈を用いた検討

ラットより摘出した大動脈より mRNA を抽出し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR 法を用いて各種 mRNA の発現変動を検討した。血管内皮機能に関連する因子として、内皮性 NO 合成酵素 (eNOS)、神経性 NO 合成酵素 (nNOS)、誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) について検討した。eNOS、nNOS に関しては、いずれの期間においてもコントロール群とデュタステリド投与群の間で発現に有意な差は見られなかった。iNOS に関しては、いずれの期間においても 40 サイクルでも検出されなかった。

##### 陰茎海綿体を用いた検討

ラットより摘出した陰茎海綿体を用い、大動脈と同様にリアルタイム PCR 法を用いて各種 mRNA の発現変動を検討した。大動脈の結果同様、eNOS、nNOS、iNOS に関してはいずれの期間においてもコントロール群とデュタステリド投与群の間で発現に有意な差は見られなかった。この結果は Hellstrom らの結果とは異なる結果となった。デュタステリドによる勃起機能低下が NO 合成系の関与ではない可能性が示唆された。また、男性ホルモン受容体 (AR) について検討したところ、AR においてもコントロール群とデュタステリド投与群の間で発現に有意な差は見られなかった。また、血管収縮物質である 1 や Rho キナーゼについて検討してもコントロール群とデュタステリド投与群の間で発現に有意な差は見られなかった。一方、酸化ストレス産生に関与する NADPH oxidase について検討したところ、デュタステリド投与群で有意な発現の上昇が観察された ( $P < 0.05$ )。さらに、炎症性サイトカインのひとつである IL-6 について検討したところ、デュタステリド投与群で有意な発現の上昇が観察された ( $P < 0.05$ )。これらの結果より、デュタステリド投与により、NO 産生系や収縮系には変化が見られないものの、陰気海綿体においては酸化ストレスが発生し、組織炎症が生じる可能性が示唆された。

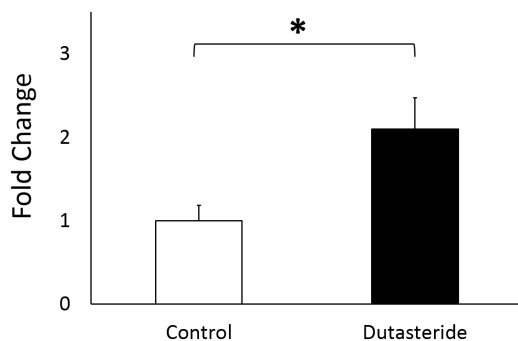


図 6. 陰茎海綿体における IL-6 の発現変化

以上の結果より、デュタステリド投与において勃起機能低下が引き起こされる可能性が示唆された。そのメカニズムとして、従来考えられていた NO 産生系の低下による者では

なく、酸化ストレスの産生により陰茎海綿体において炎症性サイトカインが発生したことが一因と考えられる。去勢ラットを用いた検討でも同様に酸化ストレスの産生が増加しており、炎症性変化が生じることが判明しており、今回のデュタステリド投与による DHT の低下は酸化ストレスの産生系に影響を及ぼす可能性が示唆される結果となった。一方、大動脈においては当尺性張力測定の結果、血管内皮機能や平滑筋機能に影響を及ぼさないことが示唆される結果となった。摘出した大動脈を組織学的に検討しても、デュタステリド投与による影響は観察されなかった。また、陰茎海綿体と同様に NO 産生系の因子に関しては影響を及ぼさなかった。デュタステリド摂取により、心血管疾患発症のリスクは増大される可能性は低いと考えられるが、ED の発症には関与する可能性が示唆される結果となった。そのメカニズムとして DHT 低下による酸化ストレスの産生が亢進し、炎症性サイトカインの産生も亢進した。組織炎症が生じると陰茎海綿体のみではなく、全身での炎症も生じている可能性があり、引き続き検討する予定である。

#### 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)

〔学会発表〕(計 6 件)

片岡智哉, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲 『Testosterone 低下による酸化ストレスおよび炎症マーカーの変動 去勢による ED モデルラットを用いた検討』、第 14 回日本抗加齢医学会総会、2014 年 6 月、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

片岡智哉, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲 『Testosterone が酸化ストレスおよび炎症マーカーに与える影響 去勢ラットを用いた Androgen 補充療法と抗酸化物質投与との比較』、日本性機能学会 第 25 回 学術総会、2014 年 9 月、仙台市情報産業プラザ(宮城県仙台市) Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K.

『Influences of Testosterone Deficiency for Oxidative Stress and Inflammation Markers in Castrated Rats』、16th World Meeting on Sexual Medicine、2014 年 10 月、サンパウロ(ブラジル)

堀田祐志 『勃起減少は何に制御されるか? - 創薬へとつなげる標的分子』、第 25 回日本性機能学会中部総会(招待講演)、2015 年 6 月、ハービス PLAZA(大阪府大阪市)

堀田祐志, 木村和哲 『虚血に伴う勃起不全および下部尿路症状に対する PDE-5 阻害剤の「連日」投与による効果』、医療薬学フォーラム 2015/第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム(招待講

演) 2015年7月、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)  
木村和哲 『「性機能研究の最前線」基礎研究から見えてきた ED 治療の新たな兆し』、第26回日本性機能学会学術総会(招待講演) 2015年9月、福岡国際会議場・福岡サンパレス(福岡県福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 和哲 (KIMURA, Kazunori)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00423848

### (2) 研究分担者

前田 康博 (MAEDA, Yasuhiro)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号: 60275146

堀田 祐志 (HOTTA, Yuji)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 90637563

### (3) 連携研究者

佐々木 昌一 (SASAKI, Shoichi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 50225869

### (4) 研究協力者

片岡 智哉 (KATAOKA, Tomoya)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 20737928