

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15693

研究課題名(和文)4次元制御可能なNOドナーによる新規ED治療法の開発

研究課題名(英文)The development of a novel ED therapy by four-dimensional controllable NO releasers

研究代表者

堀田 祐志 (HOTTA, Yuji)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：90637563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自に開発した青色光に反応して一酸化窒素(NO)を放出するNOBL-1を用いて勃起制御を試みた。陰茎海綿体は白膜という結合組織により包まれており、青色光が白膜を透過できない問題点が生じた。光の透過性は波長が長い方が優れるため方針を変更し、より長波長の光によりNOを放出する化合物を新たに開発することにした。その結果、黄緑色光によりNOを放出する化合物NO-Rosa、近赤色光によりNOを放出する化合物NORD-1の二つの化合物を新たに開発することに成功した。両化合物ともに、陰茎、大動脈での弛緩反応の制御が可能であることも明らかにした。現在、両化合物の生体レベルでの応用をすすめている。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to control the erection by using NOBL-1, a blue light controllable nitric oxide releaser, which we previously developed. However it was difficult because there is a problem that the light could not permeate through tunica albuginea around penile corpus cavernosum. Thus, next, we tried to develop the new light controllable NO releasers which is controlled by light of longer wave length. As the results, we succeeded to develop two new NO releasers which can be controlled by yellowish-green light and near-infrared light. We found that both compounds and light irradiation could control the relaxation of aorta. Now we are proceeding the application for in vivo levels.

研究分野：男性性機能障害

キーワード：一酸化窒素 男性性機能障害 光応答性 4次元

### 1. 研究開始当初の背景

PDE-5 阻害剤により勃起不全 (ED) の治療は画期的な進歩をとげた。PDE-5 阻害剤は cGMP の分解を阻害することで NO/cGMP シグナルを亢進するが、糖尿病や前立腺全摘手術後の患者では、NO 産生能自体が低下しているため PDE-5 阻害剤の効果が低いことが報告されている。このような状態では、NO ドナーが有効かもしれないが、頭痛や血圧低下など全身への副作用が懸念される。

これまでに、我々は「光応答性 NO ドナー」に着目し検討を行ってきた。共同研究者の家田が作成した NO releaser by blue light (NOBL)-1 という青色光により NO が放出される化合物を用いることで大動脈の弛緩反応を照射により空間的 (3 次元) かつ時間的 (1 次元) に、つまり 4 次元で制御することに成功した (図 1) (Ieda N, Hotta Y, et. al. J Am Chem Soc. 14;136:7085-7091. 2014.)。このことから NOBL-1 と光照射を利用することで、空間的かつ時間軸での NO 産生の制御が可能となった (図 1)。白膜を取り除いた陰茎海綿体を用いた等尺性収縮弛緩実験においても大動脈と同様に弛緩反応を制御することができた。しかし、*in vivo*での ED 治療への有用性は未だ不明である。

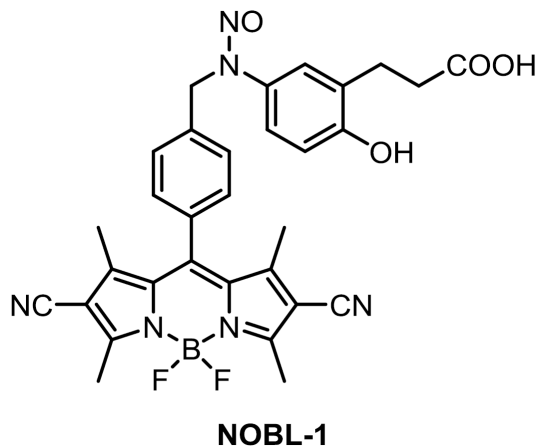


図 1. NOBL-1 の構造式

### 2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した光応答性 NO ドナー「NOBL-1」を用いて ED 治療への応用が可能か検討することを目的とする。また新規開発した NO-Rosa, NORD-1 の有用性についても明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 陰茎海綿体の弛緩制御

Wistar-ST ラットから摘出した陰茎を用いて光応答性 NO ドナー NOBL-1 と光照射により陰茎海綿体の弛緩反応が制御できるか等尺性収縮弛緩実験を行った。陰茎組織は、白膜を除去したものと除去してないものを作成し、白膜の有無により弛緩制御に影響が出る

か検討した。実験は図 2 の通り行った。また実験は内因性の NO 産生を除去するため L-NAME を前投与し行った。

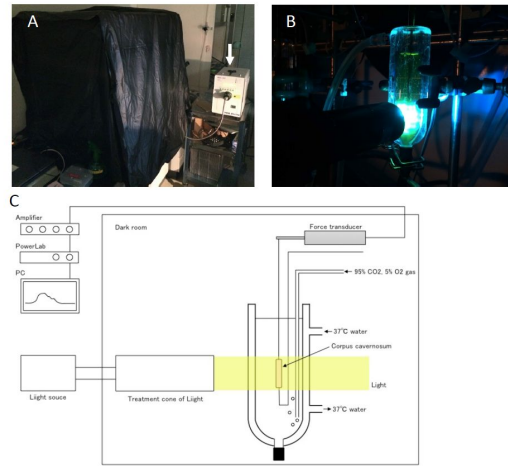


図 2. 等尺性弛緩実験の方法。

(A) 実験風景の外観、(B) マグナス管への光照射、(C) 実験の模式図

#### (2) 黄緑色光応答性 NO ドナーの開発

NOBL-1 を開発したノウハウをもとに、より長波長の光応答性 NO ドナーの開発を行った。修飾基に Rosamine を利用し黄緑色光に反応する NO-Rosa を合成した。NO-Rosa が黄緑色光に反応して NO を放出することを、ESR スピントラッピング法および NO 電極を用いて確認した。

#### (3) 細胞実験

HEK-293 細胞を用いて NO-Rosa 添加時の光照射による NO 産生の応答性を検討した。

#### (4) 大動脈の弛緩制御

(2) で新たに開発した NO-Rosa, NORD-1 を用いて弛緩制御可能か検討した。検討方法は (1) と同様に等尺性収縮弛緩実験を用いて行った。

#### (4) 近赤外応答性 NO ドナーの開発

NO-Rosa の構造を基に、近赤外光で制御可能な NO ドナーである NORD-1 を合成した。NORD-1 が近赤外光に反応して NO を放出することを、ESR スピントラッピング法および NO 電極を用いて確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) NOBL-1 による陰茎海綿体弛緩制御

等尺性収縮弛緩実験により、NOBL-1 と青色光により陰茎海綿体の弛緩制御が可能か検討した。白膜を除去した陰茎海綿体では、NOBL-1 と青色光照射により陰茎海綿体の弛緩制御が可能だったが、白膜を除去していない陰茎海綿体では弛緩制御ができなかった。この問題として、青色光の組織透過性の低さ

が考えられた。そこで次により長波長で応答する光応答性 NO ドナーを開発することにした。

#### (2) NO-Rosa の開発と細胞での NO 産生

NO-Rosa が黄緑色光に応答して NO を放出することを、ESR スピントラッピング法および NO 電極を用いて確認した。HEK293 細胞に新たに開発した NO-Rosa 添加し、除去後光照射により NO が産生され、細胞内にも NO-Rosa が取り込まれ NO 産生能も保持されることを確認した (図 3)。

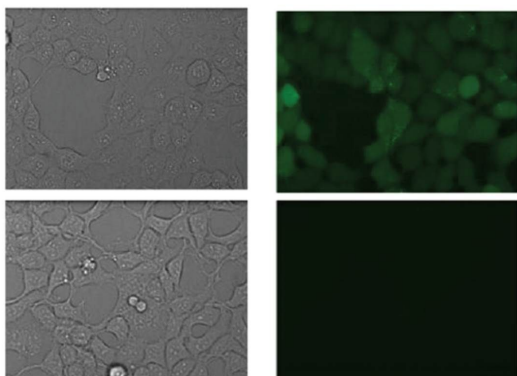


図 3. HEK293 細胞による NO 放出実験 (上段) NO-Rosa 添加あり、(下段)添加なし、蛍光 (緑) は NO 産生を表す。

#### (3) NO-Rosa を用いた陰茎海綿体制御

大動脈および白膜を取り除いた陰茎海綿体における弛緩反応の制御を検討した。NO-Rosa の添加前では、黄緑色光照射により反応は見られないが、NO-Rosa 添加後では光照射に応じて弛緩反応が見られることを明らかにした。さらに光照射を止めたあと、テンションが元に戻ることも明らかにした (図 4)。

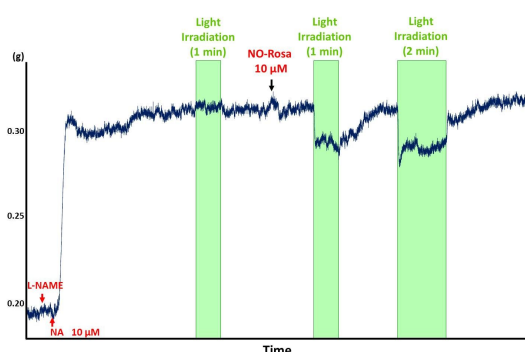


図 4. 陰茎海綿体の NO-Rosa による弛緩制御 緑の帯は光照射を表す。NO-Rosa 添加後では光照射に応じて弛緩反応が見られ、照射を止めるとテンションが元に戻ることが観察される。

#### (4) 近赤外光応答性 NO ドナーの開発

新たに近赤外光応答性 NO ドナーの開発を行った。(2)、(3)同様に細胞実験、大動脈の収縮弛緩実験を行い、光照射に応答した NO

産生ならびに弛緩制御が可能であることを明らかにした。

本課題における一連の研究から、新たに黄緑色光応答性 NO ドナー「NO-Rosa」、近赤外光応答性 NO ドナー「NORD-1」の作成に成功した。当初の青色光応答性 NO ドナー「NOBL-1」よりも光の組織透過性が高いことから、*in vivo*への応用が期待できる。今後、生体応用を目指して更なる検討を進めていく。

#### 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 3 件)

Itthipol Sungwienwong, John J. Ferrie, Joomyung V. Jun, Chunxiao Liu, Taylor M. Barrett, Zachary M. Hostetler, Naoya Ieda, Amara Hendricks, Anand K. Muthusamy, Rahul M. Kohli, David M. Chenoweth, George A. Petersson, and E. James Petersson.

Improving the Fluorescent Probe Acridonylalanine Through a Combination of Theory and Experiment *J. Phys. Org. Chem.*, in press.

John J. Ferrie, Naoya Ieda, Conor M. Haney, Christopher R. Walters, Itthipol Sungwienwong, Jimin Yoon, and E. James Petersson.

Multicolor protein FRET with tryptophan, selective coumarin-cysteine labeling, and genetic acridonylalanine encoding *Chem. Commun.*, 53, 11072-11075 (2017)

Hana Okuno, Naoya Ieda, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura and Hidehiko Nakagawaa.

A yellowish-green-light-controllable nitric oxide donor based on N-nitrosoaminophenol applicable for photocontrolled vasodilation. *Org. Biomol. Chem.*, 15(13):2791-2796. 2017.

[学会発表](計 13 件)

堀田祐志

若手研究者が取り組む泌尿器薬理の最前線「性機能研究の最前線と新規治療法」

日本薬学会第 138 年会.2018.

(招待講演)

山内彩樺、家田直弥、堀田祐志、川口充康、木村和哲、中川秀彦  
赤色光作動性 NO ドナーの合成と機能評価

日本薬学会第 138 年会. 2018

Naoya Ieda, Hana Okuno, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa.

Development of visible light controllable nitric oxide releasers and biological application  
日本化学会第 98 春季大会. 2018.

Yuji Hotta, Ieda Naoya, Tomoya Kataoka, Yasuhiro Maeda, Hidehiko Nakagawa, Kazunori Kimura

Light-controlled relaxation of rat penile corpus cavernosum by a novel NO donor, NO-Rosa.  
World Meeting on Sexual Medicine 2018. 2018.

家田直弥, 奥野華, 堀田祐志, 川口充康, 木村和哲, 中川秀彦.

光化学反応を駆使した光制御 NO ドナー群の開発と生体応用  
異分野融合を見据えた次世代レドックス生理科学シンポジウム. 2018.

Naoya Ieda, Hana Okuno, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa.

Development of Visible light-controllable NO donors and their biological applications.  
8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan eith International Symposium on Coenzyme Q10. 2017.

山内彩樺, 家田直弥, 堀田祐志, 川口充康, 木村和哲, 中川秀彦  
赤色作動性 NO ドナーの合成と機能評価  
第 35 回メディスケミストリーシンポジウム. 2017.

堀田祐志

薬学の立場から新たな ED 治療薬の開発を目指して  
日本性機能学会第 28 回学術総会. 2017.  
(招待講演)

家田直弥, 奥野華, 堀田祐志, 川口充康, 木村和哲, 中川秀彦

可視光で制御可能な NO ドナー類の合成と血管弛緩制御への応用  
第 63 回日本薬学会東海支部 総会・大会. 2017.

家田直弥, 奥野華, 堀田祐志, 川口充康, 木村和哲, 中川秀彦

可視光で制御可能な NO ドナーの開発と生体応用

第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2017.

家田直弥, 奥野華, 堀田祐志, 川口充康, 木村和哲, 中川秀彦

可視光で制御可能な N-nitrosoaminophenol 型 NO ドナー類の開発  
日本ケミカルバイオロジー学会第 12 年会. 2017.

Kazunori Kimura.

Novel Approach for Arteriogenic and Endocrinergic Erectile Dysfunction.  
The 2nd International Joint Meeting of Pan-Asian Men's Health Forum and Annual Meeting of KSSMA 2017. 2017.  
(招待講演)

Hana Okuno, Naoya Ieda, Yuji Hotta, Mitsuyasu Kawaguchi, Kazunori Kimura, Hidehiko Nakagawa.

Nitric oxide donor controllable with yellowish green light.  
252nd ACS National Meeting. 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀田 祐志 (Hotta, Yuji)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号：90637563

### (2) 研究分担者

家田 直弥 (Ieda, Naoya)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：00642026

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

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

### (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

中川 秀彦 (Nakagawa, Hidehiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：80281674

### (4) 研究協力者

矢萩 亮 (Yahagi, Ryo)

中村 大学 (Nakamura, Daigaku)