

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20155

研究課題名(和文) 小児期における睡眠不足が将来の性機能に及ぼす影響の薬理的説明

研究課題名(英文) Influence of insufficient sleep in children on erectile function; a study in the rat.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的時差ボケ(CJL)処理による睡眠障害モデルラットを作成し、性機能への影響を検討した。通常、ラットは12時間毎の明暗サイクル下で飼育されるが、明暗サイクルを2日毎に8時間前進させる処理を行う慢性的時差ボケ(CJL)処理を行った。CJL処理の1週間後ではICP/MAPが 0.81 ± 0.12 であり、変化は見られなかった。また、2週間後では 0.73 ± 0.12 であり変化しなかったが、4週間後では 0.35 ± 0.05 と有意な低下が観察された。CJL処理4週間後のラットの陰茎海綿体を用いてeNOSおよびリン酸化eNOSの発現をウエスタンブロッティング法により検討したところ、CJL処理群で有意な低下が観察された。

研究成果の概要(英文)：We made sleep disorder model rats and investigated the effect on the sexual function. Normally, rats were raised under a light / dark cycle every 12 hours, but a chronic jet lag (CJL) treatment was performed which performed a process of advancing the light / dark cycle by 8 hours every 2 days. The ICP/MAP ratio was 0.81 ± 0.12 at 1 week after CJL treatment, and no change was observed. In addition, after 2 weeks it was 0.73 ± 0.12 , which did not change, but after 4 weeks a significant decrease of 0.35 ± 0.05 was observed. When the expression of eNOS and phosphorylated eNOS was examined by western blotting method using the corpus cavernosum of rats 4 weeks after CJL treatment, significant decreases were observed in the CJL treatment group.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：睡眠障害 勃起障害 テストステロン

1. 研究開始当初の背景

本邦の小児の就寝時刻は、図1に示すように諸外国に比べて極めて遅く、睡眠時間の低下が深刻である¹⁾。本邦ではコンビニエンスストアや外資系スーパーなど24時間営業の店舗数の拡大やインターネットの発達などによる夜更かし習慣が増加し、明暗サイクルの乱れによる睡眠不足が問題となっている。親の生活習慣の乱れは子どもの生活習慣にも大きく影響し、深夜であるにも関わらず子どもと一緒にスーパーで買い物をする親も少なくない。睡眠不足は日中の集中力低下を招くだけでなく、睡眠不足が続くと健康被害をもたらすことが知られている。特に小児における睡眠不足は、ホルモンの異常や将来の性機能に悪影響を及ぼすことが危惧される。

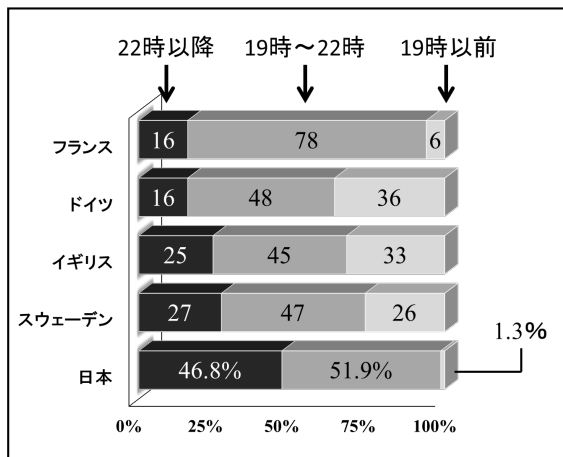


図1 小児の就寝時刻の国際比較

文部科学省 (2008年)

概日リズムを乱す不規則な生活は肥満や糖尿病、がんなどのリスクを高めることが報告されている²⁾。興味深いことに、Davidsonらは老齢マウスを用いて強制的に時差ボケ状態を繰り返す実験を行ったところ、マウスが次々に死亡したことを報告した³⁾。当該研究においてはマウスが死亡したメカニズムを解明するに至っていないが、睡眠不足により心血管機能障害を引き起こしたことが考えられる。しかし、現在も他の研究者によっても解明されておらず、これまで睡眠障害が心血管機能に及ぼす影響や作用メカニズムを詳細に検討した報告は存在しない。

申請者は睡眠障害モデルのひとつとしてリスペリドンをラットに投与しラットの勃起機能を評価したところ、睡眠障害モデルラットでは勃起障害(ED)を発症することを発見した。このリスペリドン投与ラットでは血管内皮機能障害と血管平滑筋の収縮異常が引き起こされていることを示し、2015年の日本性機能学会第26回学術総会で報告した(J Sex Med. in preparation)。

これまで申請者は性ホルモンの変化が勃起機能に及ぼす影響の研究を行い国内外で発表してきた^{4,6)}。特に過食による2型糖尿

病モデルラットを用いた研究では、主要な男性ホルモンであるテストステロンが低下し、血管内皮機能低下や組織構造が障害され、ラットの勃起機能が低下することを示し、生活習慣の乱れが性ホルモンの異常を招き、EDを引き起こすことが示唆された⁴⁾。

2. 研究の目的

リスペリドンを用いた先行研究では薬物による睡眠障害の影響を検討したが、本研究においては慢性的時差ボケ(CJL)処理による睡眠障害モデルラットを作成し、性ホルモン等の内分泌系の関与にも着目し、小児期における睡眠障害が将来の性機能に及ぼす影響を薬理学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法を用いて作用メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

通常、ラットは12時間毎の明暗サイクル下で飼育されるが、本研究では明暗サイクルを2日毎に8時間前進させる処理を行う慢性的時差ボケ(CJL)処理を行い、睡眠障害モデル動物を作成し、ラットの勃起機能への影響を検討した。

本研究を遂行するにあたり、小児ラットの陰茎海綿体組織がわずかしが採取できない事が考えられたため、性成熟が完了した12週齢の雄性Wistar/STラットを用い、CJL処理を4週間行い、通常の12時間毎の明暗サイクル下で飼育するControl(Cont)群とCJL処理下で飼育するCJL群を作成し下記の検討によりラットの勃起機能を評価した。

さらに4週齢の雄性Wistar/STラットを用い、通常の12時間毎の明暗サイクル下で飼育するCont群とCJL処理下で飼育するCJL群を作成し、以下の2つの期間の検討を行った。

まず、睡眠障害が性機能へ及ぼす急性期の影響を調べるため、1, 2, 4週間を研究期間とし、各観察期間終了時点において以下の項目を検討し、ラットの勃起機能を評価した。さらに、小児期における睡眠障害が将来の性機能へ及ぼす影響を調べるため、4週間CJL処理を行い、その後4, 8週間は12時間毎の通常の明暗サイクル下で飼育し、観察期間終了時点において以下の検討を行い、ラットの勃起機能を評価した。

A) 生理学的評価:

陰茎海綿体内圧(ICP)測定法を用いて勃起機能をin vivoで評価した^{4,5)}。ICP測定法ではイソフルランを用いて麻酔をかけ、麻酔下のラットの左総頸動脈を露出させ血管内に左総頸動脈カニューレを挿入し、二重結紮により固定を行い、動脈圧を測定した。動脈圧の測定には50 U/L heparinで満たしたpolyethylene (PE)-50チューブをカニューレとして用い、圧トランスデューサー(PowerLab 2/26, ADInstruments, CO USA)に接続して動脈圧をモニターした。左側陰茎脚

を露出させ、23 G 注射針付きカニューレを陰茎脚から挿入し、アロンアルファハイスピード EX で固定し、ICP を測定した。ICP の測定には 50 U/L heparin で満たした PE-50 チューブの先端に 23G 注射針を接続したものをカニューレとして用い、圧トランスデューサーに接続して ICP をモニターした。陰茎内の圧力をモニターし、前立腺付近に存在する海綿体神経を 5 V, Duration 5 msec の条件にセットした Electronic Stimulator (Nihon Kohden Co, Tokyo Japan) で双極形鉤電極 (Unique Medical Co, Osaka Japan) を用いて 1-16 Hz の条件で各 1 分間電気刺激を行い、ICP の変動をモニターした。動脈圧と ICP は Chart & Scope (ADInstruments) を用いて記録、解析した。測定された ICP の最大値を動脈圧の平均血圧 (mean arterial pressure; MAP) で割った ICP/MAP を評価の指標とした。

B) 生化学的評価:

血中の性ホルモン濃度分析用に観察期間終了後、下大静脈より血液を採取し、ペノジェクト II 真空採血管 (VP-AL076K, テルモ) を用いて 4℃、800 g で 10 分間遠心分離を行い、血漿を得た。得られた血漿は分析まで -80℃ で保存した。血中テストステロン濃度をテストステロン測定用キット (Testosterone (Serum) ELISA, APO ALPCO Diagnostics) を用いて測定した。

C) 分子生物学的評価:

ICP 測定終了後、ラットの陰茎を摘出し、尿道や陰茎背静脈などを剥離し、陰茎海綿体のみを得た。得られた陰茎海綿体は分析まで -80℃ で保存した。摘出した陰茎海綿体から ISOGEN を用いて添付プロトコールに従い total RNA を抽出した。得られた total RNA を用いて、260 nm と 280 nm の吸光度を測定した。260 nm の吸光度を 280 nm の吸光度で除した値が 1.8 以上のサンプルについて逆転写反応を行った。得られた total RNA 1 μg から、ReverTra Ace-[®] を用いて表 3 の組成で 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は 42℃ 20 分間、99℃ 5 分間の条件で行った。合成した cDNA は milli Q で 5 倍に希釈し -20℃ で保存した。real-time PCR 解析には各 primer が sense primer と antisense primer が 5 μM となるよう調整し、CFX Connect[™] リアルタイム PCR 解析システム (BioRad) を用いて real-time PCR を行った。反応条件は 50℃ 2 min、95℃ 10 min、95℃ 15 sec、60℃ 1 min (40 cycle) で行った。解析には Ct 法を用いて GAPDH との比で比較した。

摘出した陰茎海綿体より Cell Culture Lysis Reagent (Promega) を用いてタンパク抽出を行った。陰茎海綿体を Lysis Reagent 中でホモジナイズし、その後 15 分氷上で静置した。その後遠心分離し上清を回収しタンパク濃度を BCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology) を用いて測定した。回収したサンプルは Laemmli Sample Buffer

(Bio Rad) で等量混合し、100 μg で 10 分間インキュベートした。その後、30 μg タンパク量のサンプルを用いて 10% SDS-PAGE gel で泳動し PVDF 膜 (Immobilin) に転写した。転写後の PVDF 膜は、5% skim milk in TBST (tris-buffered saline tween-20) にて室温で 1 時間ブロッキング処理し、mouse monoclonal anti-TGF-β1 in TBST (1:100) もしくは mouse monoclonal anti-β-actin in 5% skim milk (1:5,000) にて 4℃で一晩インキュベートした。TBST にて洗浄後、anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase in TBST (1:5,000) にて室温で 1 時間インキュベートした。その後、再び TBST にて洗浄し ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) にて発色しバンドを ImageJ 1.43u にて解析した。

4. 研究成果

性成熟完了後の 12 週齢のラットにおける 4 週間の CJL 処理後の ICP 測定の結果を図 2 に示す。海綿体神経の電気刺激における周波数を増加させるにつれ、ICP/MAP も増加が見られた。16 Hz において、CJL 群 (0.40 ± 0.03) では Cont 群 (0.66 ± 0.04) に比べて有意な ICP/MAP の低下が観察された。つまり、4 週間の CJL 処理によって、勃起機能が低下することが示唆された。

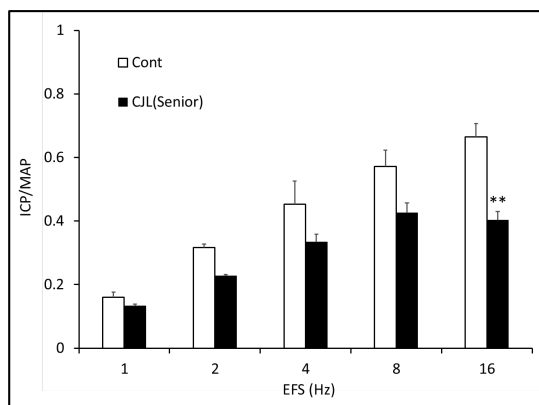


図 2 12 週齢ラットにおける勃起機能

**P < 0.01 vs Cont. Mean ± SEM. (n = 4)

また、12 週齢のラットにおける 4 週間の CJL 処理後の血中テストステロン値を図 3 に示す。Cont 群と CJL 群には変化が見られなかった。

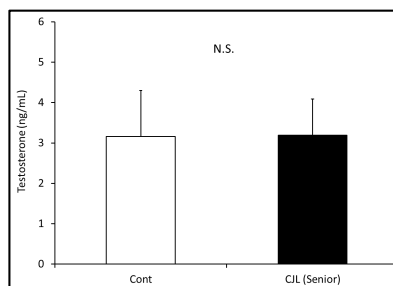


図 3 12 週齢ラットのテストステロン値

N.S.; not significance, Mean ± SEM. (n = 4)

一方、4週齢のラットにおけるCJL処理後のICP/MAPの変化を観察した結果を図4に示す。なお、4週齢時のラットにおいてICP測定を試みたが、ラットが小さいためICP測定は困難であった。16 HzにおけるICP/MAPはCJL処理の1週後に 0.82 ± 0.12 、2週後に 0.73 ± 0.02 、4週後に 0.35 ± 0.05 と変化した。CJL処理の1週後に比べて、4週後では有意なICP/MAPの低下が観察され、小児期のラットにおいても睡眠時間の低下が勃起機能を低下させることが明らかとなった。

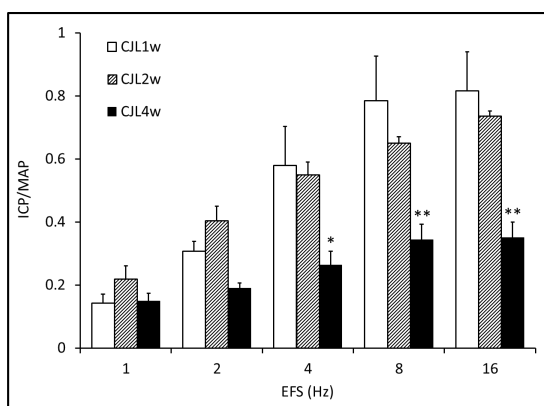


図4 4週齢ラットにおける勃起機能

*P < 0.05, **P < 0.01 vs CJL 1w. Mean \pm SEM.

(n = 3-8)

また、4週間のCJL処理後に通常の明暗サイクルに戻して飼育した場合のICP/MAPの変化を図5に示す。4週間のCJL処理後、4週間の通常明暗サイクルに戻したところ、ICP/MAPは 0.47 ± 0.05 となり4週間のCJL処理後とは変化が見られなかった。一方、4週間のCJL処理後、8週間の通常明暗サイクルに戻したところ、ICP/MAPは 0.81 ± 0.02 となり4週間のCJL処理後に比べて有意に勃起機能が改善した。

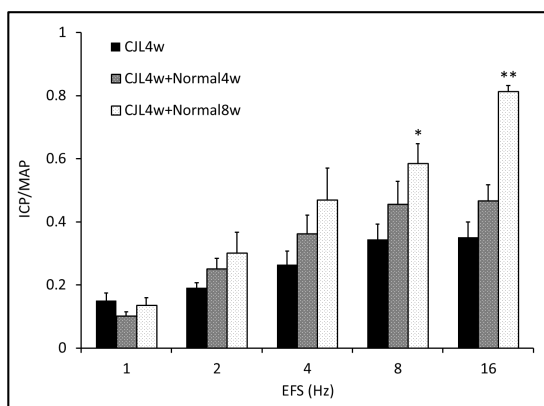


図5 通常明暗サイクル後の勃起機能

*P < 0.05, **P < 0.01 vs CJL 4w. Mean \pm SEM.

(n = 4-8)

以上の結果より、CJL処理によりラットの勃起機能を低下させることが示唆された。これらの影響は性成熟完了後のラットだけでなく、小児期のラットにおいても観察された。

小児期のラットを用いて継続的に勃起機能の変化を観察したところ、2週間のCJL処理では勃起機能に変化が見られなかったが、4週間のCJL処理によって勃起機能の低下が観察された。一方、4週間のCJL処理後に通常の明暗サイクルに戻した時の勃起機能の変化を観察したところ、4週間の通常明暗サイクルでは改善しなかったが、8週間では改善が見られた。つまり、小児期における睡眠不足が続くと将来の性機能に悪影響をもたらすことが示唆された。これらの影響は通常の生活に戻してもすぐには改善せず、かなりの時間を要する可能性が示唆される。

今回、男性ホルモンに着目して検討を行ったが、CJL処理を行っても男性ホルモン値に変化が見られなかった。近年、Pastuszak AWらによって睡眠不足と勃起障害に関する臨床報告が出版され、睡眠時間が低下すると勃起障害を発症する割合が増加することが報告された³⁾。しかし、これらの患者の血中テストステロン値には変化が見られなかったことを報告している。本研究でも同様に睡眠時間はテストステロン値には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

また、CJLによる勃起障害の発症メカニズムを明らかにするため、リアルタイムPCRを用いて様々な勃起機能関連因子について検討を行ったが、有用な結果は得られなかった。特に共同研究者と研究している浸水ストレスラットを用いた勃起障害発症メカニズムの研究においては、ラットを水のはったケージで飼育して、不眠状態を作るモデルではRho-A/Rho-kinase経路の亢進が観察され、勃起機能に影響していることが確認されている。そのため、本研究においても検討したところ、Rho-kinase-1のmRNAが有意に増加していた。しかし、ウエスタンブロッティング法によりタンパク発現量の変化を観察したところ、mRNAの結果とは反対にCJL処理によって発現量の低下が観察された。CJL処理は時計遺伝子とも関連が深く、今後はこれらの因子も含めてさらに検討を続けていきたい。

引用文献

- 1) 文部科学省『家庭で・地域で・学校でみんなで早寝早起き朝ごはん - 子どもの生活リズム向上ハンドブック -』2008.
- 2) Willyard C. *Nat Med.* 2008 ;14:477-480.
- 3) Davidson AJ, Sellix MT, Daniel J, Yamazaki S, Menaker M, Block GD. Chronic jet-lag increases mortality in aged mice. *Curr Biol.* 2006;16:R914-916.
- 4) Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K. Assessment of androgen replacement therapy for erectile function in rats with type 2 diabetes mellitus by examining nitric

- oxide-related and inflammatory factors. *J Sex Med.* 2014;11:920-929.
- 5) Kataoka T, Hotta Y, Ohno M, Maeda Y, Kimura K. Limited effect of testosterone treatment for erectile dysfunction caused by high-estrogen levels in rats. *Int J Impot Res.* 2013;25:201-205.
- 6) Hotta Y, Shiota A, Kataoka T, Motonari M, Maeda Y, Morita M, Kimura K. Oral L-citrulline supplementation improves erectile function and penile structure in castrated rats. *Int J Urol.* 2014;21:608-12.
- 7) Pastuszak AW, Moon YM, Scovell J, Badal J, Lamb DJ, Link RE, Lipshultz LI. Poor Sleep Quality Predicts Hypogonadal Symptoms and Sexual Dysfunction in Male Nonstandard Shift Workers. *Urology.* 2017;102:121-125.

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2件)

- 1) Kataoka T, Kimura K. Testosterone and Erectile Function, a Review of Evidence from Basic Research. InTech open; Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases. 2018. 257-272.
- 2) Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K. Testosterone deficiency causes endothelial dysfunction via elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidative stress in castrated rats. *J Sex Med.* 2017. 14:1540-1548.

[学会発表](計8件)

Kataoka T, Kimura K. Evidences of Erectile Dysfunction After Anti-cancer Agents Administration; Analysis of Large-scale Adverse Drug Reactions Database and Pharmacological Experiments. 21TH WORLD MEETING ON SEXUAL MEDICINE. 2018年3月

Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K. Testosterone deficiency causes endothelial dysfunction via elevation of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidative stress in castrated rats. 21TH WORLD MEETING ON SEXUAL MEDICINE. 2018年3月

片岡智哉. テストステロンの作用機序解明と新規治療への応用を目指して. 第174回薬学談話会 2017年10月

片岡智哉, 木村和哲. 男性性機能に関する基礎薬学研究. 第11回日本緩和医療薬学会年会 2017年6月

片岡智哉, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲. テストステロン低下によるマイクロRNA発現変動がラットの海綿体内皮機能に及ぼす影響. 日本性機能学会第28回学術総会 2017年9月

片岡智哉, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲. テストステロン低下による血管内皮機能障害発症に及ぼすマイクロRNAを介した炎症性サイトカインの影響. 日本アンドロロジー学会第36回学術大会 2017年6月

片岡智哉, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲. 去勢ラットにおける酸化ストレス関連因子の分子生物学的検討. 第7回テストステロン研究会/第16回日本Men's Health医学会 2016年7月

片岡智哉, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲. テストステロンの投与方法の違いが治療効果に違いをもたらす去勢ラットの勃起機能を指標としたテストステロン補充療法の検討 - 第16回日本抗加齢医学会総会 2016年6月

片岡智哉. テストステロン補充療法の基礎研究から見た今後の展望. 第9回東海SD研究会 2016年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

深本 絢子 (FUKAMOTO Ayako)
名古屋市立大学・薬学部・学部生

浅野 岳人 (ASANO Gakuto)
名古屋市立大学・薬学部・学部生

日高 隼也 (HIDAKA Junya)
名古屋市立大学・薬学部・学部生

鈴木 純 (SUZUKI Jun)
名古屋市立大学・薬学部・学部生

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

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

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