

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16742

研究課題名(和文)4次元制御可能なNOドナー「NO-Rosa」の軟膏製剤化とED治療への応用

研究課題名(英文)Preparation of ointment preparation of 4-dimensionally controllable NO donor "NO-Rosa" and its application to ED treatment

研究代表者

堀田 祐志 (HOTTA, Yuji)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師

研究者番号：90637563

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では光制御可能なNOドナーを用いて勃起不全(ED)治療への応用を検討した。研究期間中に新たに組織透過性が高い赤色光(630-690 nm)応答性NOドナー「NORD-1」の開発に成功した。in vitroおよびin vivo試験から、NORD-1と光照射により陰茎海綿体の弛緩制御および勃起反応の増強が可能であることを見出した。PDE5阻害薬難治性として知られる神経性EDモデルを用いて、NORD-1と光照射の有効性を明らかにした。また用いた波長の光は厚さ1cmの肉片でも光を透過することを確認した。これらの成果から、光制御可能なNOドナーは新たなED治療法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

勃起不全(ED)の治療薬として、現在ホスホジエステラーゼ5(PDE5)阻害薬が利用されているが、前立腺がんの全摘出術後のEDや糖尿病に伴うEDでは効果が低い。この要因の一つにPDE5の上流に位置する一酸化窒素(NO)産生の低下があげられる。今回我々は、光制御可能なNOドナーに着目し、EDモデルへの有効性を個体レベルで明らかにした。光応答性NOドナーは、光照射の部分のみ、また光を照射している時間のみNOを放出することが可能という特徴を有している。この特徴を活かすことで、全身作用を避けた画期的なED治療法の開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文): In this study, we investigated the application of light-controlled NO donors in the treatment of erectile dysfunction (ED). We developed a new red light (630-690 nm) controllable NO donor, NORD-1. From the results of in vitro and in vivo studies, we found that NORD-1 and light irradiation could potentiate to control relaxation of penile corpus cavernosum and enhance the erectile function. Next, we demonstrated the efficacy of NORD-1 and light irradiation in a neural ED model. In addition, it was confirmed that the red light could penetrate even a piece of 1 cm thick meat. These results suggest that light-controlled NO donors may be useful as a new treatment for ED.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：勃起不全 光制御 NOドナー NORD-1 in vitro in vivo

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホスホジエステラーゼ5 (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 阻害剤は環状グアノシンリン酸 (cGMP) の分解を阻害することで一酸化窒素 (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。

そこで我々は、「光応答性 NO ドナー」に着目し検討を行ってきた。光応答性 NO ドナーは光照射を利用することで、空間的 (3次元) かつ時間軸 (1次元)、つまり4次元レベルでのNO産生の制御が可能である(図1)。我々は独自に光応答性 NO

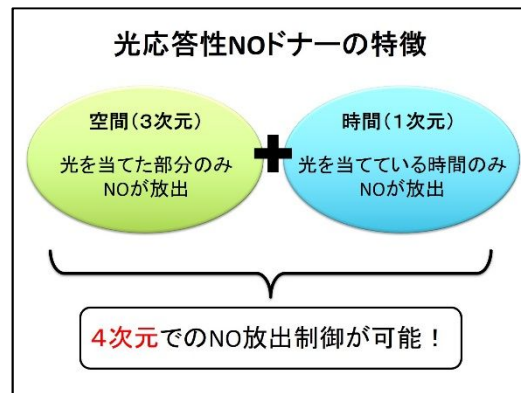


図1. 光応答性 NO ドナーの特徴

ドナーの開発をすすめ、青色光 (470-500 nm) で NO が放出される NO releaser by blue light (NOBL) -1 の開発に成功した。摘出した大動脈および陰茎海綿体を用いた実験から、NOBL-1 と青色光照射により弛緩反応が制御可能であることを見出した[1,2]。

そこで次に我々は、NOBL-1 の軟膏製剤を作成し生体レベルで勃起制御ができるか試みた。しかし、生体レベルでの勃起の制御は困難であった。一般に波長が長いほど組織の透過性が良いため、青色光では組織透過性が低いことが要因としてあげられる。この点を解決するため、我々は、組織透過性がより高い黄緑色光 (530-590 nm) で NO を産生する応答性 NO ドナー「NO-Rosa」を新たに開発した [3]。本研究では、この NO-Rosa を用いて生体レベルでの勃起現象の制御が可能か検討し ED 治療への応用を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、NO-Rosa の軟膏製剤を作成し、生体レベルでの勃起の制御が可能かどうか、病態モデルを用いて ED 治療への応用が可能かどうかの2点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 光応答性 NO ドナーの開発

当初 NO-Rosa での検討を予定していたが、より長波長で組織透過性の高い赤色光応答性の NO ドナー「NORD-1」の開発に成功したため、以降の研究は NORD-1 で進めることに計画を修正した。

(2) 陰茎海綿体の弛緩制御 (in vitro 試験)

Wistar-ST ラットから摘出した陰茎海綿体を用いて光応答性 NO ドナー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。まず、Wistar-ST ラットに麻酔をかけて光応答性 NO ドナーもしくは vehicle を陰茎脚から注入した。その後ラットを安楽死させ、陰茎海綿体を摘出し実験に用いた。陰茎海綿体は周囲を白膜という結合組織に覆われており、収縮弛緩反応を観察する際には除去された陰茎海綿体を用いることが多い。今回の研究では光が白膜を通るかどうかについても検討する必要があるため、白膜を除去していない組織を用いた。また、実験は内因性の NO 産生を除去するため L-NAME を漸騰して行った。

(3) 勃起機能評価 (in vivo 試験)

勃起機能の評価は、陰茎海綿体内圧測定法により行った。Wistar-ST ラットを麻酔下で全身血圧モニター用のカニューレと陰茎海綿体内圧 (ICP) モニター用のカニューレをそれぞれ頸動脈と陰茎脚へ留置した。海綿体神経を双極電極を用いて電気刺激することで勃起反応を惹起した。刺激条件は 5V, パルス幅 5msec, 2 or 8Hz, 1 min とした。光応答性 NO ドナーの陰茎前後および光照射 (4段階の強度; 4.6, 23.3, 45.6, 105.9 mW) のコンディションでの ICP の上昇を観察した。評価は ICP を平均血圧 (MAP) で除した ICP/MAP を用いた。

(4) ED モデルに対する光応答性 NO ドナーの有効性の検討 (in vivo 試験)

難治性 ED モデルとして神経損傷 ED モデルを用いた。雄性の 8 週齢の Wistar-ST ラットを麻酔下で両側の海綿体神経を逆作動性ピンセットで 1 min 挟むことでモデルを作製した。手術の 4 週間後に、勃起機能の評価を行った。評価方法は (3) と同様である。

(5) 光透過性試験

市販の肉を厚さ 1 cm に用意し、照射装置と光度計のセンサーで挟み光の透過率を検討した。光の波長は、青色光 (470-500 nm), 黄緑色光 (530-590 nm), 赤色光 (630-690 nm) の 3 種を用いた。

(6) 軟膏製剤の検討

少量のエタノールに NORD-1 を溶解し、白色ワセリンに混合することで軟膏製剤を作製した。作成した軟膏を Wistar-ST ラットの陰茎海綿体に塗布し、(3)と同様の方法で勃起機能への変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 陰茎海綿体の弛緩制御 (*in vitro* 試験)

光応答性 NO ドナー NORD-1 を投与したラット陰茎海綿体では、ノルアドレナリン全収縮後に光照射を行ったところ、光照射に応じた弛緩反応が観察された。また、この弛緩反応は、光強度に依存していること、光照射を止めると元の張力まで戻ることを明らかにした。さらに、NO の標的となるグアニル酸シクラーゼの阻害剤である ODQ を添加することで、この反応は消失した。Vehicle を投与したラット陰茎海綿体では、光照射を行っても弛緩反応は観察されなかった。これらのことから、NORD-1 と赤色光の照射によりラットの陰茎海綿体の弛緩制御が可能であることを明らかにした。

(2) 勃起機能評価 (*in vivo* 試験)

NORD-1 投与前では、2Hz の低頻度の刺激下の ICP/MAP は、8Hz の高頻度の刺激下の ICP/MAP に比べて高値を示した。また、NORD-1 投与前では、光照射による ICP/MAP の値に変動は見られなかった。次に NORD-1 を陰茎脚から注入し、2Hz の刺激を行った。光照射なしに比べて、光照射ありのコンディションでは ICP/MAP が強度依存的に増強した。46 mW および 106 mW の光照射では、NORD-1 投与前の 8Hz と同程度の ICP/MAP の値を示した。またこの際、血圧には変動は見られなかった。このことから、NORD-1 と光照射により *in vivo* レベルで勃起反応を増強することが可能であることが初めて示された(図2)。

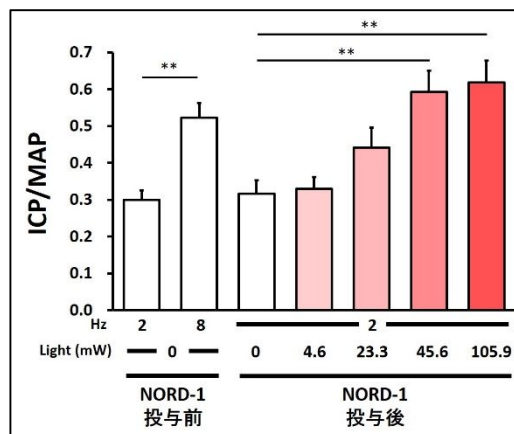


図 2. 勃起機能評価 (*in vivo* 試験)

(3) ED モデルに対する光応答性 NO ドナーの有効性の検討 (*in vivo* 試験)

神経性 ED モデルでは、NORD-1 投与前、光照射なしの条件において 2 Hz、8 Hz の刺激ともに ICP/MAP の値は 0.2 前後と低かった。NORD-1 投与後においても、光照射なしの条件では、ICP/MAP は変動せず 0.2 前後だった。一方、NORD-1 投与後に光照射ありの条件では ICP/MAP の有意な増加が見られ、勃起反応の増強が観察された(図3)。

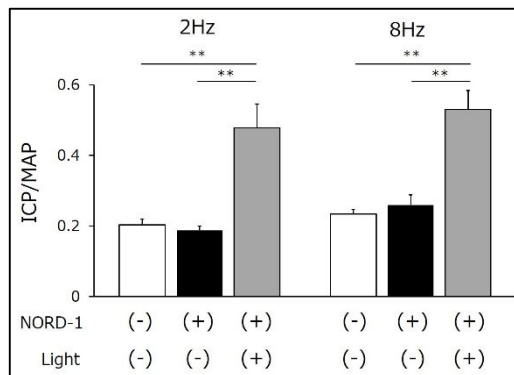


図 3. ED モデルでの勃起機能の改善効果

(4) 光透過性試験

青色光(470-500 nm)及び黄緑色光(530-590 nm)に比べて、赤色光(630-690 nm)では光の透過率が有意に高いことを明らかにした。

(5) 軟膏製剤での検討

軟膏製剤自体の作成はできたが、軟膏製剤を塗布したラットで勃起反応の増強は確認できなかった。

(6) 考察

NORD-1 と赤色光を用いることで *in vitro* および *in vivo* レベルでの陰茎海綿体弛緩制御に成功した。また病態モデルでの勃起反応の増強効果も確認できた。これまでに、我々は、光応答性 NO ドナーを用いての検討を進めてきた。本研究では、世界で初めて *in vivo* レベルでの勃起反応の改善効果を示すものであり、新たな ED 治療の方法として期待が持てる結果が得られた。また光透過性試験から厚さ 1 cm 程度の肉片を赤色光がある程度通ることも明らかになった。このことから、今回の結果が実臨床へつながることが期待される。しかしながら、本研究では、軟膏製剤で良好な結果が得られなかった。これは、軟膏製剤に含まれる薬剤の浸透が陰茎海綿体内まで十分に達することができなかったことが要因として考えられる。今後、より浸透性の高い化合物のナノ化を検討する必要があると考えている。また、実臨床へ応用する際には、毒性評価も欠かせないことから、これらの点を解決する必要があると考えられる。

< 引用文献 >

1. Ieda N, Hotta Y, et. al. *J Am Chem Soc.* 14;136:7085-7091. 2014.

2. Okuno H, Ieda N, Hotta Y, et. al. *Org Biomol Chem.* 15(13):2791-2796. 2017.
3. Hotta Y, Ieda N, et. al. *Investg Clin Urol.* 57(3):215-220. 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ieda N, Hotta Y, Kawaguchi M, Kimura K, Nakagawa H	4. 巻 67(6)
2. 論文標題 In cellulose and ex vivo availability of a yellowish-green-light-controllable NO releaser	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 576-579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c19-00112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 堀田祐志、木村和哲	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 特集 性機能障害と腎泌尿器疾患「性機能研究の最前線」	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 246-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hotta Y, Kataoka T, Mori T, Kimura K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Review of a potential novel approach for erectile dysfunction: light-controllable nitric oxide donors and nanoformulations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sex Med Rev.	6. 最初と最後の頁 297-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sxmr.2019.05.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hotta Y., Nishikawa A., Ieda N., Kataoka T., Nakagawa H., Kimura K.
2. 発表標題 The regulation of the relaxation of corpus cavernosum by near-infrared light -controlled NO donor in vivo and in vitro study
3. 学会等名 21st Congress of the European Society for Sexual Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田祐志
2. 発表標題 シンポジウム19ED研究と診療の未来 光応答性NOドナーを用いた新たなED治療薬の開発
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田祐志、西川敦士、家田直弥、森泰毅、片岡智哉、中川秀彦、木村和哲
2. 発表標題 光応答性NOドナー「NORD-1」を用いた勃起現象の制御
3. 学会等名 日本性機能学会第30回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田祐志、西川敦士、家田直弥、片岡智哉、中川秀彦、木村和哲
2. 発表標題 赤外光応答性NOドナー「NORD-1」を用いた勃起不全治療への応用
3. 学会等名 第61回 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田祐志、西川敦士、家田直弥、片岡智哉、中川秀彦、木村和哲
2. 発表標題 4次元制御可能なNOドナーの開発と勃起反応の制御
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川敦士、堀田祐志、家田直弥、片岡智哉、中川秀彦、木村和哲
2. 発表標題 近赤外光応答性NOドナー「NORD-1」による勃起反応の制御 ラットを用いた生体レベルでの検討
3. 学会等名 第29回 日本性機能学会中部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	家田 直弥 (Ieda Naoya)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教 (23903)	
研究協力者	中川 秀彦 (Nakagawa Hidehiko)	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授 (23903)	
研究協力者	片岡 智哉 (Tomoya Kataoka)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師 (23903)	
研究協力者	木村 和哲 (Kimura Kazunori)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授 (23903)	