

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19591879
 研究課題名（和文） プロスタグランジン分解代謝系遺伝子群が陰茎勃起に果たす役割に関する検討
 研究課題名（英文） A study on the role of prostaglandin metabolic clearance genes in erectile function
 研究代表者
 野村 照久（NOMURA TERUHISA）
 山梨大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：10252040

研究成果の概要：プロスタグランジン取り込み輸送体 PGT、細胞内代謝酵素 PGDH、合成酵素 COX1、COX2 のヒト海綿体組織における発現プロファイルを検索した。いずれも対 β -actin 比 10^{-2} ～ 10^{-4} 程度の強い発現を認め、陰茎、尿道、亀頭海綿体それぞれに特有の発現パターンを呈していた。プロスタノイドが海綿体機能維持に大きな役割を果たしていることを示唆するとともに、各組織における働きの違いを示すものと想定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：泌尿器科学

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：アンドロロジー

1. 研究開始当初の背景

バイアグラに代表される PDE5 inhibitor の出現以前の ED(erectile dysfunction)の確実な対症療法としては、安定化された PGE₁ 製剤などの陰茎海綿体自己注入療法が主体をなしており、現在でも PDE5 inhibitor が無効な血管性 ED に対して最も有効な治療法である。効果の安定した持続が困難であるという欠点がある反面、意外に全身的副作用が少ないという長所もあった。これらの理由として、欠点にたいしては、one shot 注入された PGE₁(本来は、プロスタグランジン分解代謝反応における第一の律速段階酵素である細胞内代謝酵素 15-PGDH

(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase)が関与しなければ血中で極めて安定)が陰茎局所に発現している代謝酵素により速やかに代謝失活され、安定した陰茎内血中濃度の維持が困難であることが、また長所に対しては、陰茎局所で代謝を免れた PGE₁ が一回の肺循環（肺はプロスタグランジンの主要代謝臓器で 15-PGDH を最も強く発現する）で多くが代謝失活され、体循環には回らないことが考えられる。この方法の長所を維持しつつ欠点を克服する方法としてのプロスタグランジン製剤の代謝酵素に対する安定化はすでに限界にきており、むしろ分解代謝系を抑制することにより、内皮細胞などから内因性に放出されるプ

ロスタグランジン(以下PGと略す;PGE₂やPGI₂などいずれも海綿体平滑筋を弛緩させあるいは血小板凝集を抑制する)の陰茎内濃度を維持するほうがより生理的かつ安定した勃起効果が得られる可能性が有る。一方、PGは本来細胞膜不透過性であり、prostaglandin transporter (PGT)などの細胞膜 carrier 無しには細胞内の15-PGDHに接触、代謝され得ない(Nomura, T. (研究代表者)ら4人、1番目、The Two-Step Model of Prostaglandin Signal Termination: In Vitro Reconstitution with the Prostaglandin Transporter and Prostaglandin 15 Dehydrogenase Mol. Pharmacol. 65(4), 973-978, 2004)。また、一つの細胞においてPG合成系(COX etc.)と分解代謝系(PGT, 15-PGDH)が分画化されて共存し、自ら放出したPGを再び取り込んで代謝失活することにより細胞周囲のPG環境を調節する(Nomura, T. (研究代表者)ら6人、1番目 Prostaglandin signaling in the renal collecting duct: release, reuptake, and oxidation in the same cell. J. Biol. Chem. 280(31), 28424-28429, 2005)。従って分解代謝系抑制のターゲットとしては細胞膜 carrier と細胞内代謝酵素の両方が考えられる。このような観点から陰茎における代謝酵素の存在確認とトランスポーターの種類を同定を行うことは、新たなED治療薬のターゲットを提供する。これまでにPGの分解代謝系トランスポーターに着目したED治療のための創薬概念は世界的にみても皆無であった。

2. 研究の目的

本研究における目的は、陰茎の勃起のメカニズムにおいて重要な役割を担っていると考えられているプロスタグランジン(PG)の、分解代謝に係る遺伝子群(トランスポーター群、代謝酵素群)の発現の多寡を同定し、それらの機能が陰茎におけるプロスタグランジン代謝に及ぼす影響や勃起に係る役割を解明することによって、これまでとは全く異なった視点からのElectile dysfunction (ED)治療薬の開発を目指すことにあった。

3. 研究の方法

検体採取及びその検索について同意の得られたヒト海綿体をサンプルとして、real-time PCR法により、プロスタグランジン合成系(COX-1, COX-2)、同分解代謝系(prostaglandin transporter PGT,

15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase PGDH)のmRNA発現定量を試みた。その後さらに1例の症例検体を追加することができた。ヒト陰茎海綿体のみの症例が4例、陰茎海綿体と亀頭海綿体の両方を得られた症例が1例、他の1例では陰茎・亀頭・尿道海綿体、陰茎腫瘍の検体を集積することができた。これらの検体では組織学的に、膠原線維や血管系から構築されているため、laser capture microdissectionによる構成成分の分離抽出は必要ないものと考えられるため、海綿体組織全体あるいは腫瘍組織全体からRNeasy® Mini Kit (Qiagen)を使用してtotal RNAを抽出した。このあと、逆転写反応によりfirst strand cDNAを作成し、gene specific primerを用いて、各遺伝子について定量的PCRを行った。

(1)逆転写反応

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV) (Roche)を使用し random hexamer primerを用いて first strand cDNAを作成。

(2)Primer 設計

NCBI database から得られた各遺伝子の mRNA coding sequence (Splicing variant が存在する遺伝子である場合はその consensus sequence)から Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)を用いて設計された。PCR product sizeは200 b.p.に近くなるようにした。

Specificity は BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)で確認された。

(3)Standard 作成

すでに発現が確認されているヒト腎臓から抽出された total RNA より合成された first strand cDNA と上記で作成された specific primer を用いて行われた PCR product を QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いてアガロースゲルから抽出、生成し、これを standard として使用した。

(4)Detection System

SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

(5)解析

SmartCycler software (Ver. 1.2d)

(6)PCR 反応

Reagent

PremixTaq[®] (Ex Taq[™] R-PCR Version) (5x)

SYBR Green I (3000x diluted with MilliQ water)

いくつかの予備実験の結果から、各遺

伝子に対して最適の反応条件を決定し、COX-1, COX-2, PGT, PGDHの mRNA レベルの発現定量を行った。House keeping gene としては、 β -actin を用いた。

4. 研究成果

陰茎海綿体組織を 6 検体、亀頭海綿体組織を 2 検体、尿道検体を 1 検体のみ収集可能であった。また、1 症例から各 3 種類の海綿体を 1 検体ずつ収集できた。

検索された各遺伝子の発現量は対 β -actin で 10^{-2} ~ 10^{-4} で、定量には十分の発現量であった。

陰茎海綿体では、プロスタグランジン合成系の代表である COX1(定常的発現酵素)、COX2(イベント的一過性強発現酵素)のいずれも強い発現が認められた。この発現比は約 20 対 1 で COX2 の発現が優勢であった。プロスタグランジン分解代謝系遺伝子のうちその取り込み輸送体の代表である PGT の発現は非常に強く、細胞内代謝酵素 PGDH の発現は PGT 発現量の約 60 分の 1 程度であった。これと比べて亀頭では陰茎と比べて PGT と COX2 の発現量は同様であったが、PGDH と COX1 の発現量はそれぞれ約 240 倍、20 倍と著しく高かった(図 1、表 1)。これらの各組織間での発現の相違により、PGT の PGDH に対する発現比 (PGT/PGDH) は亀頭海綿体で約 500 分の 1 に、COX2/COX1 比は約 17 分の 1 に低下していた(表 3)。

同様の傾向は、同一個体から得られた陰茎、尿道、亀頭の各海綿体の検索でも認められた(図 2、表 2)。この検索では、陰茎、尿道、亀頭の順に PGT の発現量が少なく、同様の順番で PGDH 発現量が多く、したがって PGT/PGDH 比は同様の順番で著しく低下していた(表 2、表 3)。

以上の結果は、各海綿体組織において、プロスタノイドがその機能、維持に非常に大きな役割を果たしていることを示唆するとともに、各組織における働きの違いを示すものと想定される。すなわち、陰茎海綿体ではイベント的強発現酵素である COX2 を主体に一過性にプロスタグランジンが合成され勃起に主体的役割を果たすが、局所的血中濃度維持のために、その細胞内代謝酵素である PGDH の発現量は限定され、強発現している PGT は主に、微細な陰茎海綿体組織の中で、その勃起機能維持に対して合目的にプロスタグランジンの移動に方向性を与えている。一方、勃起のみならず尿路としての機能を有する尿道、亀頭海綿体においては、COX1 の発現により定常的にプロスタグランジンが合成されていて、COX2 による合成を主体とする緊急的イベントである勃起のみな

らず、尿路としての機能維持に一約を担っていると想定されるが、過剰なプロスタグランジンの蓄積を解消するために、海綿体組織の中のミクロの構造のなかで部分的にプロスタグランジンの代謝失活が旺盛な部位が存在すると想像できる。

今後さらなる局在分析、機能実験等によりさらなる探索が要求される。

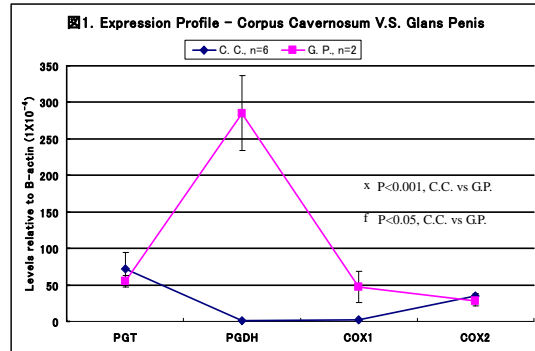


表 1. Expression Profile - Corpus Caverosum v.s. Glans Penis

levels relative to B-actin, (1x10 ⁻⁴)		PGT	PGDH	COX1	COX2	
MEAN	陰茎, n=6	N=6	72.13	1.17	2.21	34.47
	亀頭, n=2	N=2	54.83	284.99	47.49	28.64
SEM	陰茎		22.26	0.42	0.32	3.31
	亀頭		7.86	51.02	21.48	7.50
P value by unpaired t test			0.69	0.0005	0.04	0.52

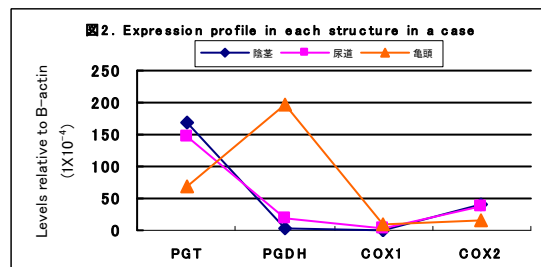


表 2. Expression Profile in each structure in a case

levels relative to B-actin, (1x10 ⁻⁴)		PGT	PGDH	COX1	COX2
陰茎		170.13	1.75	1.35	39.90
尿道		146.46	18.61	1.91	37.04
亀頭		68.45	196.62	10.28	15.64

表 3. Expression ratio of PGT v.s. PGDH

		PGT/PGDH	COX2/COX1
MEAN±SEM	陰茎	N=6	127.02±61.12
	亀頭	N=2	0.23±0.07
	尿道	N=1	7.87
P value by unpaired t test (陰茎 vs 亀頭)			0.023

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 5件)

英文

- 1 Teruhisa Nomura, Makoto Kawaguchi, Takashi Yamagishi, Hiroshi Nakagomi, Masami Aikawa, Isao Araki, Masayuki Takeda : Male Voiding Dysfunction, BPH and Didactic Urological Videos 1. Modified Retropubic Open Prostatectomy Using a Vessel Sealing System. AUA/Boehringer IngelheimDVD Library 2008 Disk1 Session 1 (2008) 査読有
- 2 Isao Araki, Takayuki Tsuchida, Teruhisa Nomura, Mizuya Fukasawa, Yoshio Takihana, Nobuyuki Koyama, Masayuki Takeda : Differential impact of lower urinary tract symptoms on generic and disease-specific quality of life in men and women. Urologia Internationalis 81, 60-65 (2008) 査読有
- 3 Du Shuqi, Isao Araki, Mitsuharu Yoshiyama, Teruhisa Nomura, Masayuki Takeda : Transient receptor potential channel A1 involved in sensory transduction of rat urinary bladder through C-Fiber pathway. Urology 70(4):826-831 (2007) 査読有

和文

- 4 小室 三津夫、荒木 勇雄、野村 照久、別府 正典、武田 正之、藪崎 昇、内山 秀行: 3. $\alpha 1$ 受容体遮断薬を使用中の患者における LUTS と ED との関連 ↓ -LUTS と ED に共通する新しい薬剤の可能性- 泌尿器外科 21(臨時増刊): 275-277 (2008) 査読有
- 5 座光寺 秀典、野村 照久、深澤 瑞也、土田 孝之、澤田 智史、神家満 学、間庭 章光、三神 裕紀、小林 英樹、荒木 勇雄、武田 正之: 山梨大学における根治的腎摘除術の術式による手術成績の比較検討と若手医師を対象に行った術式に関するアンケート調査- 体腔鏡下手術とミニマム創内視鏡下手術- Jpn Endourol ESWL 21:363-368 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 17件)

海外

- 1 Hideki Kobayashi, Mitsuharu Yoshiyama, Isao Araki, Hidenori Zakoji, Norifumi Sawada, Noboru Yabusaki, Takayuki Tsuchida, Teruhisa Nomura, Mizuya Fukasawa, Masayuki Takeda : Contribution of acid-sensing ion

channels to sex differences in mouse bladder response to acetic acid: A novel candidate for interstitial cystitis pathogenesis. The 3rd Pan-Pacific Continence Society Meeting (Taiwan) (2008.9.26)

- 2 Masayuki Takeda, Hidenori Zakoji, Takayuki Tsuchida, Yuuki Mikami, Takashi Yamagishi, Teruhisa Nomura, Mizuya Fukasawa, Isao Araki : Laparoscopic adrenalectomy ↓ ↓ Adrenal incidentaloma. 11th World Congress of Endoscopic Surgery (Yokohama) (2008.9.3)
- 3 Takashi Yamagishi, Hidenori Zakoji, Mizuya Fukasawa, Teruhisa Nomura, Takayuki Tsuchida, Yoshio Takihana, Isao Araki, Masayuki Takeda : High incidence of non-detected tumor (pT0) after neoadjuvant endocrine treatment and radical prostatectomy was not correlated with lower incidence of PSA recurrence in localized prostatic carcinoma in yamanashi, Japan. AUA 2008 annual meetin (Orlando ,Florida) (2008.5.20)
- 4 Teruhisa Nomura, Makoto Kawaguchi, Takashi Yamagishi, Hiroshi Nakagomi, Masami Aikawa, Isao Araki, Masayuki Takeda : Male Voiding Dysfunction, BPH and Didactic Urological Videos 1. Modified Retropubic Open Prostatectomy Using a Vessel Sealing System. AUA 2008 annual meeting (Orlando ,Florida) (2008.5.18)
- 5 Akihiro Maniwa, Manabu Kamiyama, Yuuki Mikami, Yasuhisa Furuya, Hidenori Zakoji, Takayuki Tsuchida, Teruhisa Nomura, Mizuya Fukasawa, Yoshio Takihana, Isao Araki, Masayuki Takeda : Efficacy and safety of paclitaxel and gemcitabine combination as the chemotherapy for advanced/ mrtastatic urothelial cancer in a single center in japan. AUA 2008 annual meeting (Orlando ,Florida) (2008.5.18)
- 6 Hidenori Zakoji, Teruhisa Nomura, Takayuki Tsuchida, Mizuya Fukasawa, Yuuki Mikami, Akimitsu Maniwa, Isao Araki, Masayuki Takeda : A questionnaire-based survey of opinions about radical nephrectomy among young urologists at University of Yamanashi. 第 21 回日本 endourology ・ ESWL 学会総会 (東京) (2007.11.28)
- 7 Hidenori Zakoji, Teruhisa Nomura,

- Takayuki Tsuchida, Mizuya Fukasawa, Yuuki Mikami, Akimitsu Maniwa, Isao Araki, Masayuki Takeda : Comparison of laparoscopic surgery and portless endoscopic surgery for renal cell cancer at University of Yamanashi. 第 21 回日本 endourology・ESWL 学会総会 (東京) (2007.11.28)
- 8 Jiang Yuan Jun, Hideki Kobayashi, Norifumi Sawada, Mitsuharu Yoshiyama, Hidenori Zakoji, Teruhisa Nomura, Mizuya Fukasawa, Isao Araki, Masayuki Takeda : Expression profiles of prostaglandin E2 receptor subtypes in human bladder mucosa with bladder outlet obstruction. The 2nd Pan-Pacific continence society meeting (soul, Korea) (2007.10.19)
- 9 Hideki Kobayashi, Isao Araki, Hidenori Zakoji, Du Shuqi, Norifumi Sawada, Tsutomu Mochizuki, Mitsuharu Yoshiyama, Takayuki Tsuchida, Teruhisa Nomura, Mizuya Fukasawa, Yoshio Takihana, Masayuki Takeda : Expression profiles of prostaglandin E2 receptor subtypes in human bladder mucosa with bladder outlet obstruction. 37th ICS 2007 (Rotterdam, The Netherlands) (2007.8.22)
- 10 Du Shuqi, Isao Araki, Teruhisa Nomura, Mitsuharu Yoshiyama, Masayuki Takeda : Agonists of transient receptor potential channel a1 cause hyper-reflexic micturition by affecting bladder afferent activity in rats. AUA 2007 annual meeting (Anaheim, USA) (2007.5.21)
- 国内
- 11 萱沼 賢司、野村 照久、山岸 敬、間庭 章光、三神 裕紀、座光寺 秀典、土田 孝之、深澤 瑞也、荒木 勇雄、武田 正之 : 腎腫瘍に対する腎部分切除術の検討—開放手術・体腔鏡下手術・ミニマム創手術の比較— 第 96 回日本泌尿器科学会総会 (横浜) (2008.4.27)
- 12 野村 照久、間庭 章光、萱沼 賢司、山岸 敬、武田 正之 : ヒト前立腺癌における prostaglandin 分解代謝系遺伝子発現異常の検討 第 96 回日本泌尿器科学会総会 (横浜) (2008.4.25)
- 13 野村 照久、間庭 章光、三神 裕紀、山岸 敬、羽根田 破、萱沼 賢司、荒木 勇雄、武田 正之 : ミニマム創内視鏡下前立腺全摘除術における両行性アプローチの改良 第 96 回日本泌尿器科学会総会 (横浜) (2008.4.25)
- 14 荒木 勇雄、都 書[†]、姜 元軍、澤田 智史、望月 勉、小林 英樹、野村 照久、武田 正之 : ヒト膀胱および前立腺における温度感受性イオンチャネル(TRPA1 と TRPM8)の発現様式と BOO/BPH による発現変化 第 96 回日本泌尿器科学会総会 (横浜) (2008.4.25)
- 15 野村照久、川口真琴、山岸敬、羽根田破、間庭章光、荒木勇雄、武田正之、相川雅美、中込宙史、寺本咲子、滝花義男 : ベッセルシーリングシステム LigaSure TM Xtd を用いた恥骨後式前立腺皮膜下摘除術の工夫 第 72 回日本泌尿器科学会東部総会 (札幌) (2007.8.30)
- 16 野村照久、中込宙史、川口真琴、三神裕紀、間庭章光、望月勉、高木孝治、澤田智史、石川覚之、荒木勇雄、武田正之 : ミニマム創内視鏡下前立腺全摘除術の工夫 第 95 回日本泌尿器科学会総会 (神戸) (2007.4.16)
- 17 川口真琴、野村照久、高木孝治、石川覚之、中込宙史、間庭章光、三神裕紀、澤田智史、土田孝之、深澤瑞也、滝花義男、荒木勇雄、武田正之 : ミニマム創内視鏡下前立腺全摘除術—逆行性アプローチと順行性アプローチの比較検討 第 95 回日本泌尿器科学会総会 (神戸) (2007.4.15)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他] なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
野村 照久 (NOMURA TERUHISA)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 1 0 2 5 2 0 4 0
- (2) 研究分担者
武田 正之 (TAKEDA MASAYUKI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号 : 8 0 1 9 7 3 1 8
- (3) 連携研究者
なし