

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659758

研究課題名（和文）

中枢神経系を標的とした心因性勃起障害発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of psychogenic erectile dysfunction in the central nervous system

研究代表者

坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20363971

研究成果の概要（和文）：

性機能に関わる脊髓局所神経回路を明らかにする目的で、超高压電子顕微鏡下で免疫二重電顕を試み、コンピュータトモグラフィ法を応用した超微神経形態の三次元立体再構築法を確立した。次いで、雄の性機能の評価として、ラットを用いて性行動中の神経活性をリン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ（pERK）の gastrin-releasing peptide（GRP）ニューロンにおける発現を解析した。結果、雄の性行動中に脊髓 GRP ニューロンの多くが活性化されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We applied the high-voltage electron microscopy (HVEM) tomography assisted by light microscopy to a study of the 3-D chemical neuroanatomy of the rat lower spinal cord annotated by double-labeling immunohistochemistry. This powerful methodology is useful for studying molecular and/or chemical neuroanatomy at the 3-D ultrastructural level. The induction of phosphorylated extracellular signal-related kinase (pERK) is well accepted as a marker for neuronal activation. Consequently, we studied the expression of pERK in the gastrin-releasing peptide (GRP) neurons after ejaculation. This revealed that pERK induction in the GRP neurons appeared to be specifically associated with ejaculation, suggesting the activation of GRP neurons during male sexual behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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：泌尿器科学、アンドロロジー、男性性機能、勃起障害、アンドロゲン、中枢神経系、ホルモン、脊髓

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々はラットを用いた基礎研究から、神経ペプチド gastrin-releasing peptide (GRP) を含むニューロンが、脊髄内に複雑な神経回路を雄特異的に構築し、勃起を含む男性（雄）の性機能を生理的に調節していることを発見した。本研究では、この新規に同定した脊髄内勃起中枢をターゲットとして、勃起障害 (ED) の病態生理メカニズムを解析する。本研究の発展により、ED の原因究明・治療法開発に新規のアプローチ法を提案できる。既に我々は、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などのストレス疾患モデル動物を用いた研究から、トラウマ的ストレス負荷が脊髄 GRP ニューロンシステムを破綻へ導くことを明らかにしつつある。

2. 研究の目的

(1) 性機能に関わる脊髄局所神経回路を明らかにする目的で、超高压電子顕微鏡下で免疫二重電顕を試み、コンピュータトモグラフィ法を応用した超微神経形態の三次元立体再構築法を確立した。(2) 雄の性機能の評価として、ラットを用いて性行動中の神経活性をリン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ (pERK) の GRP ニューロンにおける発現を解析した。(3) GRP 遺伝子プロモーターの下流に緑色蛍光タンパク質 (Venus) の cDNA を繋いだ遺伝子のトランスジェニック (GRP-Venus Tg) ラットの作出を試みた。

3. 研究の方法

(1) 脊髄 GRP ニューロン線維は、射精に関わると考えられており、GRP 受容体を発現している自律神経核 (SPN) へと投射している。我々は、脊髄 GRP ニューロンから SPN への軸索の投射を、超高压電子顕微鏡 (岡崎生理学研究所; HVEM) を用いて、超微形態レベルで解析した。HVEM は数 μm の厚さを持つ切片を超微形態レベルで解析することができる。雄ラット脊髄において、GRP と SPN のマーカーである神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS) に対して二重免疫電顕法を行い、脊髄 GRP ニューロン線維の SPN への入力を明らかにした。今回、一方の免疫組織化学法をナノゴールド-銀増感法で、また他者を従来のジアミノベンジジン法によって、超高压電子顕微鏡下で二者を区別する免疫二重電顕法を応用し、三次元立体再構築による効率的な解析を行った。(2) 卵巣摘出した雌ラットをホルモン投与によって人為的に発情させ、成熟雄と掛け合わせることで、雄ラットの性

行動解析を行った。射精にまで至った雄ラットを、射精から 10 分後、直ちに灌流固定を行い、脊髄 (L3-L4 レベル) を用いて GRP と pERK に対する二重免疫染色を行った。GRP ニューロンにおける pERK 共発現率を解析した。

(3) ラット GRP プロモーター遺伝子のクローニングを行った。GRP 遺伝子プロモーターの下流に Venus の cDNA を繋いだトランスジェニック・コンストラクトを作製、ラット受精卵に当該コンストラクトのマイクロインジェクションを行った。

4. 研究成果

(1) 超高压電子顕微鏡下、二重免疫電顕技術を応用したコンピュータトモグラフィ・三次元立体再構築法を用いて、脊髄 GRP ニューロンを指標にし、脊髄内各種神経ネットワークを詳細に解析することに成功した。今後は、ED モデルラットを用いて、脊髄 GRP ニューロンシステムについて詳細な解析を行うことができる。(2) 雄ラットを用いて性行動中の神経活性を pERK の脊髄 GRP ニューロンにおける発現を解析した。その結果、雄の性行動中に脊髄 GRP ニューロンが高確率で活性化されることを明らかにした。一方、性行動を行っていない雄の GRP ニューロンでは pERK は、ほとんど発現していなかった。

(3) GRP 遺伝子プロモーターの下流に Venus の cDNA を繋いだ遺伝子のトランスジェニック (GRP-Venus Tg) ラットの作出に成功した。GRP-Venus Tg を用いれば、生きた状態で GRP ニューロンを選択的に蛍光標識することが可能となり、GRP-Venus Tg ラットにおいて GRP 系を中心とした脊髄内神経ネットワークを生きた状態で詳細に解析することができる。

今後の展望：

さらなる多角的な解析を通して、GRP ニューロンシステムを中心とした雄の性機能を制御する脳-脊髄間神経ネットワークとその動作メカニズムを解明することができる。

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)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① T. Sakamoto, C. Mori, S. Minami, H. Takahashi, T. Abe, D. Ojima, M. Ogoshi, H. Sakamoto: Corticosteroids stimulate the amphibious behavior in mudskipper: Potential role of mineralocorticoid receptors in teleost fish. *Physiology & Behavior* 104: 923-928 (2011), DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.06.002.
- ② H. Sakamoto: The gastrin-releasing peptide system in the spinal cord mediates masculine sexual function. *Anatomical Science International* 86: 19-29 (2011), DOI: 10.1007/s12565-010-0097-z.
- ③ K. Tsutsui, K. Ukena, H. Sakamoto, S.-I. Okuyama, S. Haraguchi: Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the Purkinje cell. *Frontiers in Endocrinology (Neuroendocrine Science)* 2, 61: 1-9 (2011), DOI: 10.3389/fendo.2011.00061.
- ④ K. I. Matsuda, H. Mori, B. M. Nugent, D. W. Pfaff, M. M. McCarthy, M. Kawata: Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology* 152: 2760-2767 (2011), DOI: 10.1210/en.2011-0193.
- ⑤ T. Oti, K. Satoh, K. Saito, K. Murata, M. Kawata, T. Sakamoto, H. Sakamoto: Three-dimensional evaluation of the spinal local neural network revealed by the high-voltage electron microscopy: a double immunohistochemical study. *Histochemistry and Cell Biology* 138: 693-697 (2012), DOI: 10.1007/s00418-012-0976-6.
- ⑥ A. Yoshida, T. Morihara, K.-I. Matsuda, H. Sakamoto, Y. Arai, Y. Kida, M. Kawata, T. Kubo: Immunohistochemical analysis of effects of estrogen on intraarticular neurogenic inflammation in a rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Connective Tissue Research* 53: 197-206 (2012), DOI: 10.3109/03008207.2011.628059.
- ⑦ H. Sakamoto, K. Satoh and T. Oti: Achieve orgasm? Oxytocin triggers ejaculation in men. *Reproductive System & Sexual Disorders* 1: e101 (2012), DOI: 10.4172/2161-038X.1000e101.
- ⑧ H. Sakamoto: Brain-spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neuroscience Research* 72: 103-116 (2012), DOI: 10.1016/j.neures.2011.11.002.
- ⑨ H. Sakamoto, H. Takahashi, K.-I. Matsuda, M. Nishi, K. Takanami, M. Ogoshi, T. Sakamoto, M. Kawata: Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. *Frontiers in Bioscience* 17: 996-1019 (2012), DOI: 10.2741/3970.
- ⑩ H. Sakamoto, M. Kawata: Ultrahigh voltage electron microscopy links neuroanatomy and neuroscience/neuroendocrinology. *Anatomy Research International* Article ID: 948704 (2012) 5 pages, DOI: 10.1155/2012/948704.
- ⑪ T. Nanba, H. Takahashi, T. Abe, W. Godo, M. Ogoshi, H. Sakamoto, N. Tsutsui, T. Sakamoto: Hemolymph osmotic, ionic status and branchial Na^+/K^+ -ATPase activity under varying environmental conditions in the intertidal grassid crab, *Gaetice depressus*, *International Aquatic Research* 4:18 (2012) 12 pages, DOI: 10.1186/2008-6970-4-18.
- ⑫ S. I. Okamoto, T. Ikeda, K. Sawamura, M. Nagae, M. Hase, Y. Mikami, Y. Tabata, K. I. Matsuda, M. Kawata, T. Kubo: Positive effect on bone fusion by the combination of platelet-rich plasma and a gelatin β -tricalcium phosphate sponge: A study using a posterolateral fusion model of lumbar vertebrae in rats. *Tissue Engineering* 18: 157-166 (2012), DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0283.
- ⑬ T. Hashimoto, K. I. Matsuda, M. Kawata: Scaffold attachment factor B (SAFB)1 and SAFB2 cooperatively inhibit the intranuclear mobility and function of ER α . *Journal of Cellular Biochemistry* 113: 3039-3050 (2012), DOI: 10.1002/jcb.24182.
- ⑭ K. I. Matsuda, H. Mori, M. Kawata: Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 13: 163-171 (2012), DOI: 10.1007/s11154-012-9202-z.
- ⑮ Y. Kida, T. Morihara, K. I. Matsuda, Y. Kajikawa, H. Tachiiri, Y. Iwata, K. Sawamura, A. Yoshida, Y. Oshima, H. Fujiwara, M. Kurokawa, M. Kawata, T. Kubo: Bleeding from humeral head induces bone marrow-derived cells to repair tendons after rotator cuff repair. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 22: 197-205 (2013), DOI: 10.1016/j.jse.2012.02.007.
- ⑯ Y. Hirahara, K. I. Matsuda, H. Yamada,

- A. Saitou, K. Morisaki, K. Takanami, J. M. Boggs, M. Kawata: G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia* 61: 420-431 (2013), DOI: 10.1002/glia.22445.
- ⑰ Y. Hirahara, K. I. Matsuda, Y. F. Liu Y, H. Yamada, M. Kawata, J. M. Boggs: 17 β -estradiol and 17 α -estradiol induce rapid changes in cytoskeletal organization in cultured oligodendrocytes. *Neuroscience* 235: 187-199 (2013), DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.070.
- ⑱ K. I. Matsuda, M. Yanagisawa, K. Sano, I. Ochiai, S. Musatov, K. Okoshi, S. Tsukahara, S. Ogawa, M. Kawata: Visualization and Characterization of oestrogen receptor α -positive neurons expressing GFP under the control of the oestrogen receptor α promoter. *European Journal of Neuroscience* (2013) in press. DOI: 10.1111/ejn.12227.
- ⑲ N. Yamada, W. C. Kim, T. Yoshida, Y. Oka, T. Ikeda, H. Fujiwara, A. Nishida, K. I. Matsuda, Y. Tabata, M. Kawata, T. Kubo: Gelatin β -tricalcium phosphate sponge with platelet-rich plasma enhances bone regeneration in a massive bone defect of ulna. *Journal of Medical and Biological Engineering* (2012) in press.

[学会発表] (計20件)

- ① 松田賢一、「脳の性分化におけるエピジェネティクスの関与」、第25回環境ホルモン学会、東京、2011年6月16日
- ② Ken-Ichi Matsuda, 「Epigenetic influence on the development of sexual behaviour」, “First Asia-Pacific Conference on Integrative Behavioral Science and Sino-Japan Integrative Symposium on Behavior and its Neuro-Mechanisms” Xi’an, China, 2011年7月23日~28日
- ③ 秋山美穂、高橋英也、荻野由紀子、宮川信一、御興真穂、井口泰泉、坂本竜哉、坂本浩隆、「メダカ脳におけるアンドロゲン受容体の発現と局在」、日本動物学会第82回旭川大会、北海道旭川市、2011年9月21日~23日
- ④ 森浩子、松田賢一、塚原伸治、河田光博、「子宮内環境がラット視床下部エストロゲン受容体の分布に及ぼす影響について」、第34回日本神経科学大会、神奈川県横浜市、2011年9月14日~17日
- ⑤ 関口翔子、坂本竜哉、坂本浩隆、「扁形動物ヒラムシにおける脳下垂体神経葉ホルモン様ペプチドを同定する試み」、第36回日本比較内分泌学会、東京都千代田区、2011年11月23日~24日
- ⑥ 坂本浩隆、「神経系と内分泌系とをつなぐ神経内分泌系：性機能を司る脳-脊髄神経ネットワークの包括研究」、第38回日本神経内分泌学会学術集会、若手シンポジウム「“かたち”と“もの”からアプローチする神経内分泌研究」、東京都千代田区、2011年11月25日~26日
- ⑦ 越智拓海、佐藤慧太、佐藤佳亮、西森克彦、坂本竜哉、松田賢一、河田光博、坂本浩隆、「オキシトシンニューロンの脊髄gastrin-releasing peptideニューロン系への遠心性投射の解析」、第38回日本神経内分泌学会学術集会、東京都千代田区、2011年11月25日~26日
- ⑧ 坂本浩隆、越智拓海、Andrew Dobberfuhl、Lesley Marson、「弱毒化狂犬病ウイルストレーサーを用いた球海綿体筋から脊髄gastrin-releasing peptideニューロンへの投射解析」、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨県甲府市、2012年3月26日~28日
- ⑨ 高浪景子、松田賢一、坂本浩隆、井上海平、河田光博、「かゆみに対するエストロゲンの作用」、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨県甲府市、2012年3月
- ⑩ Hirofumi Sakamoto, 「Regulation of male sexual functions by oxytocin-mediated volume transmission in the spinal cord」, The 2012 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology “Integrative, Experimental and environmental physiology of marine organisms”, Hawaii Institute of Marine Biology, University of Hawaii, Hawaii, USA, 2012年7月26日~27日
- ⑪ 高浪景子、松田賢一、坂本浩隆、井上海平、河田光博、「ラット搔破行動におけるエストロゲンの役割」第35回日本神経科学大会、愛知県名古屋市、2012年9月17日~21日
- ⑫ 佐藤慧太、越智拓海、モリス ジョン、加藤明子、上田陽一、坂本竜哉、坂本浩隆、「バソプレシン-eGFPトランスジェニックラットを用いた脳下垂体神経葉における放出活性」、日本動物学会第83回大会、大阪府豊中市、2012年9月13日~15日
- ⑬ 越智拓海、佐藤慧太、片山奈保、佐藤佳亮、西森克彦、松田賢一、河田光博、坂本竜哉、坂本浩隆、「間脳オキシトシン投射は脊髄ガストリン放出ペプチド系を介して雄の性機能を調節する」、日本動物学会第83回大会、大阪府豊中市、2012年9月13日~15日

- ⑭ Hiroataka Sakamoto, 「Regulation of male sexual functions by oxytocin-mediated volume transmission in the lumbar spinal cord」, International Symposium: Frontiers in Biologically Active Peptide Research, -The 3rd Meeting of the Japan Branch of International Neuropeptide Society (INPS)- “New aspects of hypothalamo-pituitary function”, West Japan Industry and Trade Convention Association, 福岡県北九州市、2012年9月29日～30日
- ⑮ 越智拓海、佐藤慧太、片山奈保、佐藤佳亮、西森克彦、松田賢一、河田光博、坂本竜哉、坂本浩隆「間脳オキソトシン投射は脊髄ガストリン放出ペプチド系を介して雄の性機能を調節する」、第39回日本神経内分泌学会学術集会、福岡県北九州市、2012年9月28日～29日
- ⑯ 佐藤慧太、越智拓海、John F. Morris、加藤明子、上田陽一、坂本竜哉、坂本浩隆、「バソプレシン-eGFPトランスジェニックラットを用いた下垂体神経葉における放出活性」、第39回日本神経内分泌学会学術集会、福岡県北九州市、2012年9月28日～29日
- ⑰ 高浪景子、松田賢一、坂本浩隆、井上海平、河田光博、「ラット感覚神経系における痒み関連分子ガストリン放出ペプチドの局在」第39回日本神経内分泌学会学術集会、福岡県北九州市、2012年9月28日～29日
- ⑱ 松田賢一、柳沢美歩、佐野一広、Sergei Musatov、塚原伸治、小川園子、河田光博、「ER α プロモーター制御下にGFPを発現する神経細胞におけるアデノ随伴ウイルスを用いたER α 発現抑制」第39回日本神経内分泌学会学術集会、福岡県北九州市、2012年9月28日～29日
- ⑲ 松田賢一、柳沢美歩、佐野一広、Sergei Musatov、塚原伸治、小川園子、河田光博、「GFPトランスジェニックマウスを用いたエストロゲン受容体 α 陽性細胞の可視化とエストロゲンシグナル抑制の影響」、第118回日本解剖学会総会・学術集会、香川県高松市、2013年3月28日～30日
- ⑳ 越智拓海、佐藤慧太、齊藤和裕、村田和義、河田光博、坂本竜哉、坂本浩隆、「超高压電子顕微鏡を用いたラット脊髄gastrin-releasing peptide系を中心とした脊髄内局所神経回路の三次元的解析」、第118回日本解剖学会総会・学術集会、香川県高松市、2013年3月28日～30日

〔図書〕(計1件)

- ① 坂本浩隆、株式会社クバプロ、「雄の性

機能をつかさどる脳-脊髄神経回路の解明」
in ブレインサイエンス・レビュー2013、
2013年2月、pp 83-101 (186ページ中)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.science.okayama-u.ac.jp/~rinkai/ushi.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 浩隆 (SAKAMOTO HIROTAKA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：20363971

(2) 研究分担者

松田 賢一 (MATSUDA KEN-ICHI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
准教授
研究者番号：40315932

(3) 連携研究者

三木 恒治 (MIKI TSUNEHARU)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・
教授
研究者番号：10243239