

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592442

研究課題名(和文)超音波照射によるヘムオキシゲナーゼ1遺伝子発現制御と勃起不全治療への応用

研究課題名(英文)Ultrasound irradiation may have therapeutic effect for erectile dysfunction by up-regulating expression of heme oxygenase-1 gene in endothelial cells.

研究代表者

渡部 明彦(Watanabe, Akihiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：20377253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞に超音波照射することによってヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)が発現増強することを見出した。プロモーターアッセイおよびマイクロアレイ解析により、酸化ストレスによるNrf/StREシグナル経路が関与していると考えられた。またラット陰茎に照射した場合においてもHO-1発現が確認できた。HO-1は抗炎症作用、抗酸化作用、血管拡張作用、血管修復作用など様々な作用を有しており、HO-1を発現誘導する超音波照射は勃起不全治療への臨床応用が期待できるものとする。

研究成果の概要(英文)：We found heme oxygenase-1 (HO-1) gene up-regulation in response to ultrasound stimulation in endothelial cells. Data obtained from promoter analysis and microarray analysis suggested that the Nrf2/StRE signal pathway induced by oxidative stress was involved in the up-regulation. Ultrasonic irradiation to rat penis enhanced HO-1 expression in the cavernous tissue. HO-1 have the anti-inflammatory, antioxidant, and vasodilatory activities in addition to proangiogenic and vascular reconstitution activities of endothelial cells. Ultrasound irradiation to penis may be applied clinically for erectile dysfunction therapy.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ-1 超音波 勃起不全 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

バイアグラ®をはじめとするホスホジエステラーゼ 5 阻害薬 (PDE5 阻害薬) は現在 ED (Erectile Dysfunction) 治療における第一選択薬となっている。PDE5 阻害薬による ED 改善率は約 70~80% と高い有効性を示し、副作用も少ないため一般医での処方も広く普及している。一方で骨盤内手術後や重度糖尿病、重度心血管系疾患などに伴う器質性 ED では PDE5 阻害薬により十分な効果が得られない症例も多く、また硝酸薬など併用内服薬によっては PDE5 阻害薬が使用できないこともある。その場合、診療ガイドラインに沿って陰圧式勃起補助具、プロスタグランジン E1 海綿体注射、プロステーシス挿入術などが考慮されるが、一概に患者の満足のいく成績を収めているとは言いがたい。しかも PDE5 阻害薬も含めこれら治療法はいずれも、使用した性行為時のみ限られた効果を発揮するものであり、陰茎勃起機能を回復する治療法ではない。つまり現在の ED 治療は自然な自発的陰茎勃起、いわゆる正常機能回復・治癒を目標とした治療には至っていないのが現状である。PDE5 阻害薬の連日内服による血管内皮機能の向上が報告されているもののその効果にも限界があり、また現在の日本においては自由診療である点からも患者側からすれば経済的に非現実的である。

近年、機能回復・治癒を目標とした新しい治療法として Rho/Rho-kinase signaling pathway を標的とした治療法、幹細胞による再生治療、低強度体外衝撃波、遺伝子治療などさまざまな基礎的臨床的研究が試みられている。遺伝子治療においてはカルシウム感受性 maxi-K チャンネル、NO 合成酵素 (NOS)、preprocalcitonin 遺伝子関連ペプチド (CGRP)、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) などの遺伝子を利用した数多くの研究が行われている。そのなかで Abdel ら [] は加齢ラットの陰茎に HO-1 遺伝子を導入し、陰茎海綿体における HO-1 活性増強、cGMP 産生増加、NOS 阻害にても血管機能の改善を認めたとして器質性 ED 治療における HO-1 の可能性を強調している。HO-1 とその代謝産物である CO やビリルビンは、血流調節/血管修復保護作用、アポトーシス抑制、抗炎症・抗酸化作用など様々な生理活性を有しているため、すでに心血管系疾患を対象として数多くの研究が報告されており、血管内皮障害が原因の器質性 ED に対する陰茎海綿体機能回復を目標とした新規治療ターゲットとしても非常に期待されている []。HO-1 発現増強法としては遺伝子導入や薬剤による誘導などが試みられているが、血管内皮細胞において HO-1 を物理的的刺激により発現増強したとの報告はない。血管内皮細胞は超音波刺激により様々な遺伝子発現を増強することが知られているが、HO-1 遺伝子発現増強の報告はない。当教室では以前に、白血球細

胞株 U937 を超音波照射することによって HO-1 発現を増強させることに成功している []。その機序は超音波による酸化ストレスへの応答であり、HO-1 は血管内皮や血管平滑筋にも存在が確認されていることから、我々は血管内皮細胞においても同様な現象が生じ得ると考えた。本研究では、血管内皮細胞に対する超音波照射による HO-1 の発現制御を試み、さらに ED 治療への応用可能性を探ることを主な目的とする。

2. 研究の目的

血管内皮細胞における超音波照射による内因性 HO-1 の発現制御を試み、さらに ED 治療応用への可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vitro 実験

ヒト陰茎海綿体血管内皮細胞の取得は困難であるため、代替モデルとして正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells)、正常ヒト臍帯動脈血管内皮細胞 (HUAEC: Human umbilical artery endothelial cells)、正常ヒト臍帯動脈平滑筋細胞 (HUASMC: Human umbilical artery smooth muscle cells) を用いた。超音波照射機器は、実際に理学療法用に販売されている Sonic master ES-2 (OG 技研社製) を in vitro 実験に使用した (図 1)。

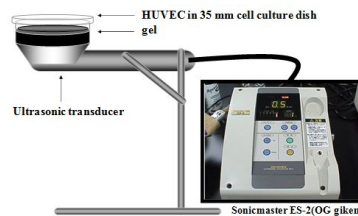


図 1 . 超音波照射装置

血管内皮細胞への超音波刺激による HO-1 遺伝子発現を定量リアルタイム PCR により定量し、タンパク発現の経時的変化はウェスタンブロッティングで検討した。超音波照射条件は 1MHz 超音波を照射強度 0.3~0.5W/cm²、照射時間 5~30 秒、10% duty factor (DF, 100Hz) とした。

HO-1 プロモーターの一部を欠失した DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したベクターを HUAEC に導入し、レポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ) を行い、またマイクロアレイ (Gene Chip®) による網羅的な遺伝子発現解析を行うことで超音波刺激により活性化するシグナル伝達経路の解析検討をした。

超音波照射した HUAEC と HUASMC を共培養し、超音波刺激単独、または非特異的 PDE 阻害薬である 3-isobutyl-1-methylxanthine (3-IM) や HO-1 阻害薬である zinc protoporphyrin IX (ZnPP-IX) を併用した場合による cGMP 合

成増加を cGMP アッセイ (cGMP Parameter Assay Kit, R&D Systems)にて評価した。

(2) in vivo 動物実験

5~7ヶ月齢のWisterラット(雄)を使用した。in vivo 実験では Sonic master ES-2 に加え、遺伝子導入用の小さなトランスデューサーを備えた Sonitron 2000 (Rich-Mar 社製)も使用した。麻酔下で Sonic master ES-2 ではラット下腹部全体に、Sonitron 2000 では陰茎局所に各機器で 1~2W/cm²、120 秒間照射した。照射後 0、12、24 時間で尾静脈より採血を行い血清中 HO-1 およびビリルビンを測定した。Sonitron 2000 で照射 24 時間後のラットを安楽死させ、陰茎を採取してホルマリン固定した後、免疫組織化学染色 (HO-1、eNOS、Masson's trichrome 染色) を行った。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞への超音波照射による HO-1 遺伝子の発現増強

定量リアルタイム PCR により HO-1 mRNA の発現は、HUVEC では 0.5 W/cm² で 10 秒間照射した 5 時間後に、非照射コントロールと比較して約 20 倍の mRNA 発現増強を認め [図 2a]、HUAEC では 0.3 W/cm² で 20 秒間照射した 5 時間後に約 33 倍の mRNA 発現増強を認め [図 2b] HO-1 タンパク発現の経時的変化の検討では、HUAEC に対して 0.3 W/cm² で 20 秒間照射した後 6 時間頃から発現増強を認め、12~24 時間後まで継続することを見出した [図 2c, d]

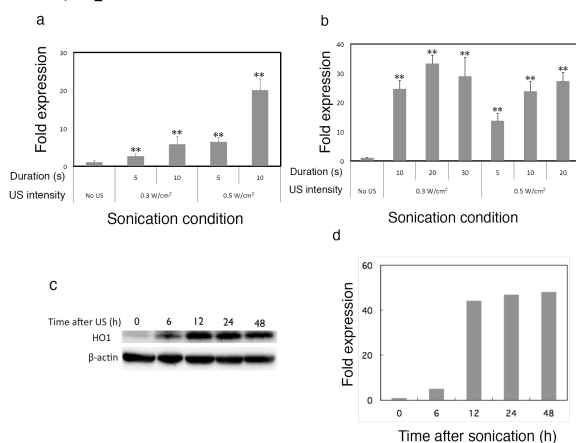


図 2. 超音波照射による HO-1 遺伝子 (a) HUVEC, b) HUAEC) およびタンパク発現 (c, d) **P<0.01

(2) 超音波刺激により活性化するシグナル伝達経路の解析

HO-1 プロモーターの一部を欠失した DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に挿入したベクターを HUAEC に導入し、照射 8 時間後にレポーターアッセイを施行したところ、開始コドンの upstream 約 5.8kb から 10kb の断片に弱い応答、開始コドンからその upstream 約 4.5kb までの DNA 断片 (F4.5) にやや強い応答を認め [図 3] 両断片ともに Nrf-2 が結合する StRE を含み、また F4.5 の StRE に変異を導入する

と応答性がなくなることから、超音波照射により亢進する細胞内酸化ストレスによる Nrf-2 の活性化を介した発現増強が示唆された。

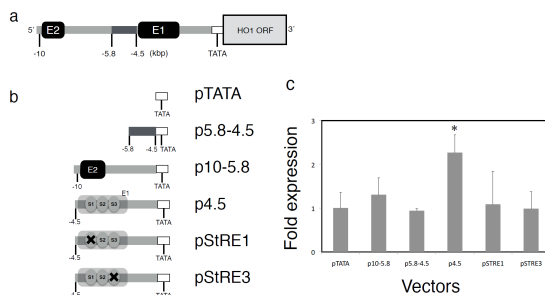


図 3. 欠失変異を導入した HO-1 プロモーターを用いたレポーターアッセイ *p<0.05

HUAEC を 0.3 W/cm²、20 秒間 10%DF で照射後 0、6、12、24 時間後にトータル RNA を抽出し、マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析したところ、照射後 6、12 時間では HO-1 遺伝子発現が顕著に増強されており [表 1] 血管弛緩や収縮に関与する Endothelin-1 シグナル経路、血管新生に関与する VEGF シグナル経路、さらに細胞内酸化ストレス応答シグナルなどのシグナル伝達経路の活性化が推測された。

a	Gene symbol	Gene title	Log ratio
	HMOX1	Heme oxygenase 1	3.642
	SERPINF2	Serpin peptidase inhibitor, clade B member 2	3.629
	OLFML2	Olfactomedin 2	2.724
	PTH1L	Parathyroid hormone-like hormone	2.665
	HIST1H4A	Histone cluster 1, H4a	2.533
	KITLG	KIT ligand	2.345
	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.212
	HIST2H2BE	Histone cluster 2, H2be	2.156
	NPTX1	Neuronal pentraxin 1	2.135
	MMP10	Matrix metalloproteinase 10	2.097

b	Gene symbol	Gene title	Log ratio
	SERPINF2	Serpin peptidase inhibitor, clade B member 2	3.479
	HMOX1	Heme oxygenase 1	3.133
	OLFML2	Olfactomedin 2	2.236
	PTH1L	Parathyroid hormone-like hormone	1.94
	LPXN	Leupaxin	1.799
	NAV3	Neuron navigator 3	1.753
	FERRMT1	Ferritin family member 1	1.729
	MMP10	Matrix metalloproteinase 10	1.696
	HIST1H4A	Histone cluster 1, H4a	1.587
	PSAT1	Phosphoserine aminotransferase 1	1.568

表 1. 超音波照射により発現増強した上位 10 遺伝子 (a) 照射 6 時間後、(b) 照射 12 時間後

(3) 超音波照射した HUAEC と HUASC の共培養系における cGMP アッセイ

超音波刺激により HUAEC 中で発現増強する HO-1 により生成される一酸化炭素 (CO) は、HUASC での cGMP 合成増強に働くことで血管弛緩に寄与すると考えられる。従って、in vitro での cGMP アッセイを施行するためには両細胞群を同じ培養系で培養する必要がある。HUAEC 用培地と HUASC 用培地を 1:1 の混合培地で培養したところ、両細胞とも 1 週間は生育することを見いだした。

HUAEC に対して 0.3 W/cm²、15 もしくは 30 秒間 10%DF で照射し、それらを HUASC と 1:1 混合培地で 15 時間培養後に回収して cGMP アッセイに供した。3-IM および ZnPP-IX は 1 mM をサンプル回収の 60 分前に添加して、それぞれの効果を検討した。超音波照射のみで処理したサンプルで cGMP の増加が認められた。

3-IM 単独で添加した場合は cGMP の増加は認められなかったが、超音波照射と 3-IM を併用した場合には相乗的な cGMP 産生増強が観察された。またそれらの増強効果は ZnPP-IX を加えることでいずれも減弱した [図 4] これらのことから、超音波刺激による HO-1 の発現増強は、cGMP 産生を増強させ、さらに PDE 阻害剤を併用することで cGMP の蓄積をさらに大きく増強することが示された。

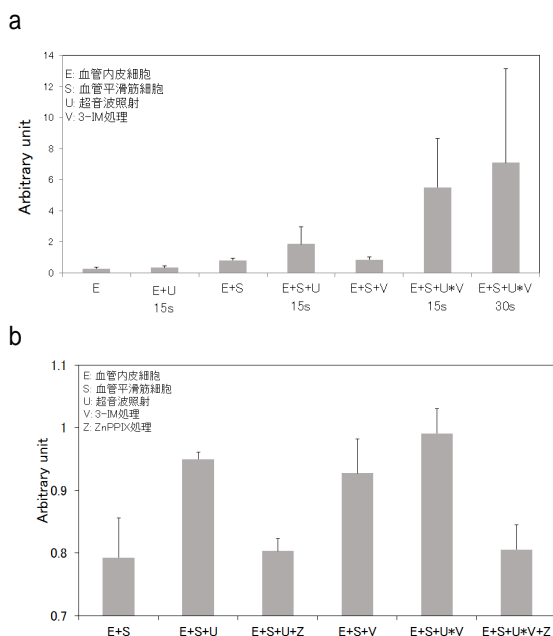


図 4. cGMP 検出定量解析
a 超音波および 3-IM 添加の効果
b ZnPP-IX 添加の効果

(4) ラット陰茎に対する超音波照射の影響

Sonic master ES-2 で下腹部全体を照射した場合と Sonitron 2000 で陰茎局所に照射した場合の血清中 HO-1 濃度の変化をみたところ、両機器で照射した場合いずれの場合においても照射後に血清中 HO-1 濃度は上昇し、 $2W/cm^2$ で照射 24 時間後に最大値を示した (図 5)。血中ビリルビン値の変化は採血量の少なさやサンプルの溶血などから、満足のいく測定ができなかったが、傾向としては HO-1 濃度のデータを同様の動きをみせた。

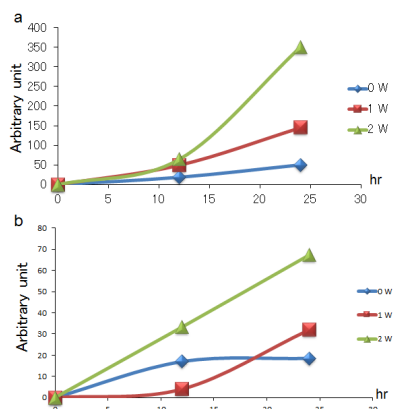


図 5. 超音波照射によるラット血中 HO-1 濃度変化 a Sonic master ES-2、b Sonitron 2000

Sonitron 2000 で照射後のラット陰茎組織の免疫組織化学染色では、超音波照射組織において eNOS はほとんど染色されなかったが、HO-1 は非照射組織に比較して染色された。Masson ' s trichrome (MT) 染色では照射組織において膠原繊維の減少が認められた (図 6)。

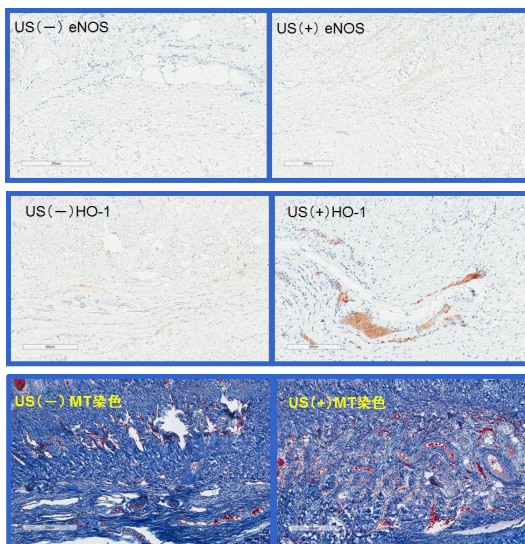


図 6. ラット陰茎組織の免疫組織化学染色

以上の結果から、超音波照射による血管内皮細胞および陰茎組織での HO-1 発現誘導は簡便であり安全性も高いと思われ、治癒を目標とした器質性 ED 治療への臨床応用が期待できるものと考えられる。

引用文献

Abdel Aziz MT, et al. Effect of HO-1 cDNA-liposome complex transfer on erectile signalling of aged rats. *Andrologia* 41:176-183,2009.

Shamloul R. The potential role of the heme oxygenase/carbon monoxide system in male sexual dysfunctions. *J Sex Med* 6:324-333,2009.

Kagiya G, et al. Expression of heme oxygenase-1 due to intracellular reactive oxygen species induced by ultrasound. *Ultra Sonochem* 13:388-396, 2005.

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 1 件)

Ryohei Ogawa, Akihiko Watanabe, Akihiro Morii. Ultrasound up-regulates expression of the heme oxygenase 1 gene in the endothelial cells. *Journal of Medical Ultrasonics*, in press. 査読有 .

〔学会発表〕(計8件)

渡部 明彦、森井 章裕、小川 良平、他。
血管内皮細胞における超音波照射による
ヘムオキシゲナーゼ1発現誘導に関する検
討。日本性機能学会第23回学術総会(2012
年9月21日、秋葉原)

渡部 明彦、森井 章裕、小川 良平、他。
血管内皮細胞における超音波によるヘム
オキシゲナーゼ1遺伝子発現制御の検討。
第17回北陸泌尿器科 Basic Research
Meeting(2013年2月2日、金沢)

渡部 明彦、小川 良平、森井章裕、他。
超音波刺激によるヘムオキシゲナーゼ1遺
伝子発現制御の試み。第101回日本泌尿器
科学会総会(2013年4月28日、札幌)

Akihiko Watanabe, Akihiro Morii, Ryohei
Ogawa, et al. Ultrasonic irradiation
enhances heme oxygenase-1 gene
expression in vascular endothelial
cells. The 14th Biennial Meeting of the
Asia-Pacific Society for Sexual
Medicine, 2013, 6, 1, in Kanazawa.

小川 良平、渡部 明彦、森井 章裕。血
管内皮細胞におけるヘムオキシゲナーゼ1
遺伝子発現変化。第22回ソノケミストリ
ー討論会(2013年10月25日~26日、松
本)

小川 良平。血管内皮細胞での超音波によ
るヘムオキシゲナーゼ-1の発現誘導と勃
起不全治療応用の基礎的検討。日本超音波
医学界第87回学術集会(2014年5月9日、
横浜)

渡部 明彦、森井 章裕、小川 良平、他。
アドバンスセミナー「勃起障害治療への新
テクノロジーの応用」-超音波照射と血管
内皮細胞におけるH0-1発現誘導-。第25
回日本性機能学会総会(2014年9月6日、
仙台)

小川 良平、森井 章裕、渡部 明彦、他。
超音波による遺伝子発現制御。第7回超音
波とマイクロバブルの相互作用に関する
シンポジウム(2014年12月19日、横浜)

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 明彦(WATANABE, Akihiko)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
助教
研究者番号: 20377253

(2) 研究分担者

森井 章裕(MORII, Akihiro)
富山大学・大学病院・診療助手
研究者番号: 20377279

小川 良平(OGAWA, Ryohei)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号: 60334736

(3) 連携研究者 なし