

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 3 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462462

研究課題名(和文) EDならびにLUTSに対する抗酸化作用に着目した予防治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for ED and LUTS induced by chronic pelvic ischemia

研究代表者

羽賀 宣博 (Haga, Nobuhiro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50586617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨盤臓器虚血(pelvic ischemia; PI)に伴って発症する膀胱機能障害と勃起障害(ED)発症のメカニズムの解明を目的とした。PIに伴う膀胱機能障害は、RhoA/ROK経路の機能亢進により生じていることを私達は既に報告している。今回は、PIに伴う勃起機能に関して検討を行った。結果は、PI群において陰茎内の間質部分の増加と、発現機能解析上、陰茎海綿体のRhoA、ROK、及びROKの発現亢進を認めた。今回の検討からは、RhoA/ROK経路の亢進に伴い、陰茎海綿体内の平滑筋の収縮が亢進し、その結果、海綿体内の血流障害が生じ、陰茎海綿体の線維化とED発症の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to elucidate the mechanism of occurrence of both the lower urinary tract dysfunction (LUTD) and the erectile dysfunction (ED) induced by chronic pelvic ischemia (PI) in the animal model. We have previously reported the PI induced LUTD via activation of RhoA/ROK pathway. Therefore, we investigated whether ED has occurred by the activation of RhoA/ROK pathway induced by PI. The result is that enhancement of the expression of RhoA, ROK, and ROK were observed in the PI group. Also, significant increase of fibrosis of penis was observed in the PI group. Thus, activation of RhoA/ROK pathway was developed by chronic PI in the rat penis. Activation of RhoA/ROK pathway induced the contraction of the smooth muscle in the penis, leading to the disturbance of blood flow of corpus cavernosum. As a result, ED might occur both by the activation of RhoA/ROK pathway and the fibrosis of penis in chronic PI.

研究分野：泌尿器科学 下部尿路機能

キーワード：慢性骨盤虚血

1. 研究開始当初の背景

(1) 勃起障害(ED)は加齢に伴い増加し、40歳代の2割、60歳代の8割がEDに罹患しているとされ、生活の質(QOL)を著しく損なう疾患である。また、EDは虚血性心疾患や脳血管障害などの血管病に先駆けて出現するセンチネル病とも呼ばれるようになり¹、その発症メカニズムの解明や治療法の確立が急務となっている。また、下部尿路症状(LUTS)も加齢に伴い患者数が増え、同様に著しくQOLを損なう疾患である。LUTS患者の転倒リスク、死亡リスクの増加も報告されている。超高齢化社会を迎える本邦において、両疾患とも解決しなければならない緊急課題である。LUTSは年齢要因とは独立したEDの危険因子であるという疫学的な調査が次々と報告されるようになり、以前は、別の疾患概念と考えられていた両疾患は、共通の病態生理学的メカニズムに伴い発症するという概念が広まりつつある。両者ともに、加齢やメタボリックシンドローム、動脈硬化やそれに伴う血流障害の関与が考えられているものの、その病態はいまだ十分に解明されていない。また、EDとLUTSの関連性を含めて包括的に評価できる実験モデルは存在していない。

(2) これまで私達は、動脈硬化症の研究に広く用いられているバルーンカテーテルによる血管内皮障害の手技を応用した、慢性膀胱虚血ラットモデルを世界に先駆けて開発した²。つまり、膀胱の上流血管である両側腸骨動脈の内皮内膜をバルーンにて擦過傷害し、高コレステロール食で飼育することにより、両側腸骨動脈の閉塞性変化とそれに伴う慢性膀胱虚血が生じ、それに伴う排尿機能障害を世界で初めて証明した。この病態モデルでは、膀胱壁内血管内膜肥厚、膀胱筋層の線維化と、RhoA/ROK経路の機能亢進も示した。同様に陰茎においても、慢性虚血状態によって、RhoA/ROK経路の機能亢進に伴い、勃起機能の低下が生じるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

動物実験モデルにおいて、RhoA/ROK経路の変化は自然発症高血圧ラットや下部尿路閉塞モデルにおいて、膀胱過活動に関与するとされている。私達の検討でも、慢性骨盤虚血はRhoA/ROK経路に影響を及ぼし、膀胱過活動をきたすことを証明した。したがって、今回、私達は勃起機能に関して、慢性骨盤虚血による陰茎海綿体内のRhoA/ROK経路の発現機能解析ならびに、組織学的検討を行い、骨盤臓器虚血に伴って発症するED・LUTS発症のメカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 慢性膀胱虚血モデルの作成

16週のSDラットを用いて、コントロール群と慢性骨盤虚血群の2群に分けて検討を行った。ラットの内腸骨動脈に、バルーンカテーテルを使用することで、血管内皮を損傷させる。その後、高コレステロール食を経口摂取させると、内腸骨動脈ならびに骨盤内の膀胱および陰茎海綿体の微小血管壁の肥厚が起こり、慢性骨盤虚血モデルが完成する。

実際の手技は、ケタミンとザイラジンによる麻酔後、2Frのフォガティカテーテルを大腿動脈から挿入し総腸骨動脈まで挿入する。その後バルーンを空気で膨らませた後、空気を抜く操作を総腸骨動脈から大腿動脈まで繰り返していく。

(2) 摘出した腸骨動脈、陰茎海綿体の組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン染色、ならびにマッソン・トリクローム染色にて、腸骨動脈の閉塞性変化の評価と、陰茎海綿体内の間質性分と平滑筋の割合を比較する。総腸骨動脈の固定の方法は、大腿動脈から血管内の凝血塊を除去するためにホルマリンを投与後、パラフィンで包埋し、5 μ mに切開する。陰茎海綿体も同様にホルマリン固定後、パラフィンで包埋し、8-10 μ mに切開する。

陰茎海綿体内の平滑筋の割合は、Image-Pro Plus 6.0(MediaCybernetics)にて測定した。平滑筋の割合は、無作為に4か所抽出し、マッソン・トリクローム染色で赤色に染まった平滑筋の部分と、青色に染まった間質の部分とを各々測定して算出した。

(3) 陰茎海綿体内の免疫染色およびウエスタンブロッティング

陰茎海綿体内のRhoA、ROKおよびROKの発現を確認するために、免疫組織学的検討ならびにウエスタンブロッティングでタンパクの発現を調べる。

4. 研究成果

(1) 摘出した腸骨動脈、陰茎海綿体の組織学的検討

コントロール群ならびに慢性骨盤虚血群の典型画像を下に示す(図1-A,B)。慢性虚血分では、マッソントリクローム染色で青色に染色される間質部分が増加している。Image-Pro Plus 6.0を用いて、平滑筋成分の割合を検討したところ、有意に慢性骨盤虚血群では、平滑筋成分が減少していた($P<0.001$)(図2)。

図1 A) マッソントリクローム染色
コントロール群

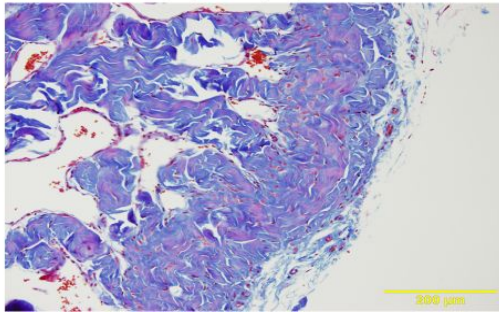


図1 B) マッソントリクローム染色
慢性骨盤虚血群

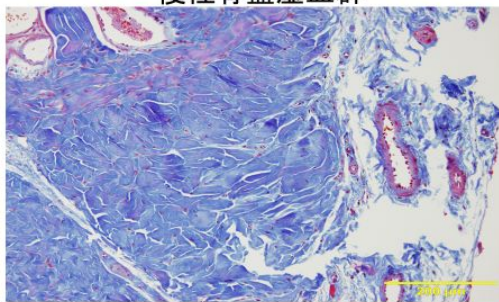
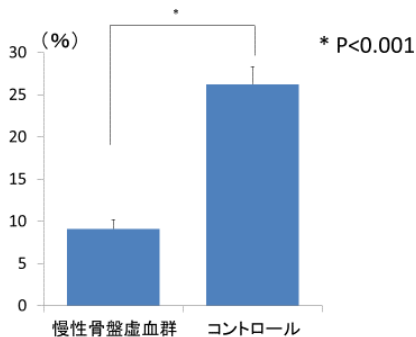


図2 陰茎海綿体内における平滑筋成分の割合



(2) 陰茎海綿体内の免疫染色およびウエスタンブロッティング

コントロール群ならびに慢性骨盤虚血群における陰茎海綿体の RhoA の発現を、図 3A と 3B に示す。ウエスタンブロッティングの結果と合わせ、Rho A は、慢性骨盤虚血群で有意に発現が増加していた ($P<0.01$)。

同様の検討を ROK および ROK において施行したところ、慢性骨盤虚血群において、ROK ($P<0.01$)、ROK ($P<0.01$)ともコントロール群と比べ有意に高発現していた。

今回の検討からは、陰茎海綿体内の RhoA/ROK 経路の亢進に伴い、陰茎海綿体内の平滑筋の収縮が亢進し、その結果、海綿体内の血流障害が生じ、陰茎海綿体の線維化ならびに ED が発症しているのではないかと考えられた。したがって、ファスジル等 Rho キナ

ーゼ阻害剤が、血管性 ED に有用である可能性が示唆された。

図3 A) コントロール群におけるRhoAの
免疫組織学的染色

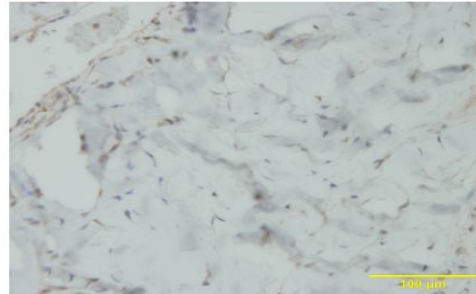
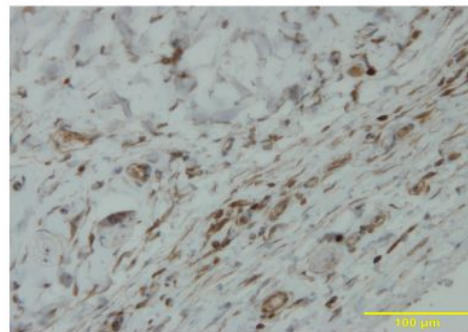


図3 B) 慢性骨盤虚血群におけるRhoAの
免疫組織学的染色



参考文献

1. Ponholzer, A., Temml, C., Obermayr, R. et al.: Is erectile dysfunction an indicator for increased risk of coronary heart disease and stroke? *Eur Urol*, **48**: 512, 2005
2. Nomiya, M., Sagawa, K., Yazaki, J. et al.: Increased bladder activity is associated with elevated oxidative stress markers and proinflammatory cytokines in a rat model of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia. *Neurourol Urodyn*, **31**: 185

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽賀宣博 (Haga Nobuhiro)
福島県立医科大学医学部・泌尿器科学講
座・助教
研究者番号：50586617

(2) 研究分担者

柳田知彦 (Yanagida Tomohiko)
福島県立医科大学医学部・泌尿器科学講
座・講師
研究者番号：20363765

(3) 研究分担者

相川健 (Aikawa Ken)
福島県立医科大学医学部・泌尿器科学講
座・准教授
研究者番号：80295419

(4) 研究分担者

石橋啓 (Ishibashi Kei)
福島県立医科大学医学部・泌尿器科学講
座・准教授
研究者番号：90347211

(5) 研究分担者

小島祥敬 (Kojima Yoshiyuki)
福島県立医科大学医学部・泌尿器科学講
座・教授
研究者番号：60305539