

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659717

研究課題名(和文) 男性機能障害モデルラットを用いた勃起障害と中枢神経ペプチド発現の比較解析

研究課題名(英文) Comparative analysis of erectile dysfunction and neural peptide in the central nervous system using erectile dysfunction model rats

研究代表者

河内 明宏 (Kawauchi, Akihiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90240952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：勃起障害(ED)におけるgastrin-releasing-peptide(GRP)の役割を明らかにするために、EDモデルラットを用いて、脊髄のGRP発現レベルを検討した。ストレプトゾトシン腹腔内投与により糖尿病モデルラットを作成し、反射性勃起試験によりED発症を確認した後、脊髄標本を採取した。現在、GRP免疫染色を施行中である、引き続き画像解析、統計解析を行う予定である。今後、神経障害性および血管性EDモデルラットでも同様の検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of gastrin-releasing-peptide(GRP) in erectile dysfunction(ED), expression levels of GRP in the spinal cords were evaluated. The diabetes mellitus model rats were made by intraabdominal injection of streptozotocine. After development of ED was confirmed by the reflex erection test, specimens of the spinal cords were taken. Immunostaining of GRP in the specimens is now being performed, and image and statistical analyses will be performed.

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

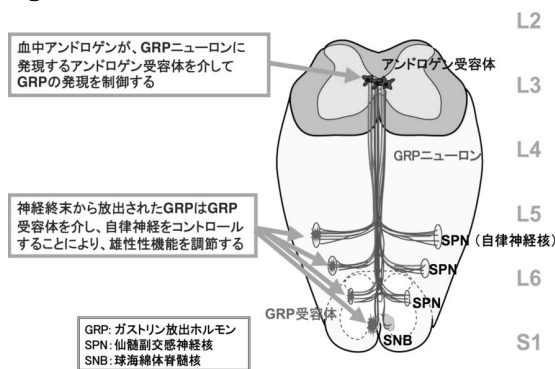
キーワード：男性性機能 アンドロロジー 勃起障害 神経生理 中枢神経

1. 研究開始当初の背景

我々は、勃起の中枢機構を解明するために電気生理学的検討を行い、視床下部の視索前野が勃起の中枢として重要な役割を果たしていることを証明した (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, Neuroscience, 2008, Brain Res, 2010)。また、EDの病態解析として糖尿病ラット陰茎脚においては増殖因子としての IGF-1 (insulin-like growth factor I) の作用が低下し、血管内皮細胞や海綿体平滑筋細胞の減少が引き起こされることにより勃起障害が誘発される可能性を報告した (Urology, 2007)。このように、生理学的な勃起の中枢機構の解明や ED の病態解析は脳幹や陰茎を対象として行われ、その機序も徐々に解明されつつある。

一方で腰髄には、男性の性機能に重要な中継核が存在する事がこれまでの研究結果により知られているが、その詳細なメカニズムについては未だに不明な点が多い。これまでに共同研究者により、神経ペプチドの一種である gastrin-releasing peptide (GRP) の発現が雌と比較し雄の腰髄に有意に高く、勃起や射精に関与していること (Nature Neuroscience, 2008; Fig.1) ならびに、アンドロゲン依存性であること (Endocrinology, 2009) などが見出された。また、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) モデルラットを用いた研究から、ストレス負荷が脊髄 GRP ニューロン系を障害することが明らかにされた (PLoS ONE, 2009)。このように、脊髄 GRP ニューロン系が ED の原因解明に大きな役割を果たすことが示唆されている。

Fig. 1



しかしながら、病的な状態での脊髄内 GRP 系の役割は解明されておらず、発症原因の異なる各種男性機能障害における脊髄内 GRP 系の比較検討は未だ行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、新規に作成した3種類の異なる機序による男性機能障害モデルラットを対象とし、EDの発症様式と脊髄内 GRP 発現レベルの比較検討を行う事で、勃起障害 (ED) と脊髄内 GRP 系の関連性につき明らかにする事を目的とする (Fig. 2A,B)。本研究の発展により、男性性機能障害の原因究明・治療法開発に新機のアプローチ法を提案できる可能性があると考えられる。

Fig. 2A

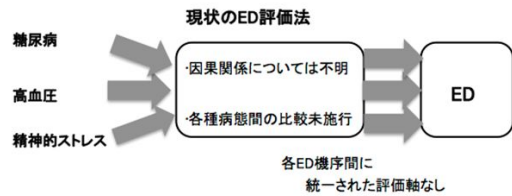
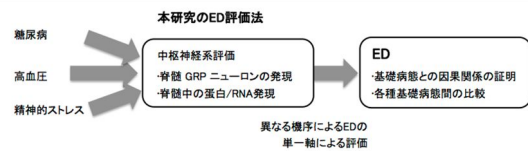


Fig. 2B



3. 研究の方法

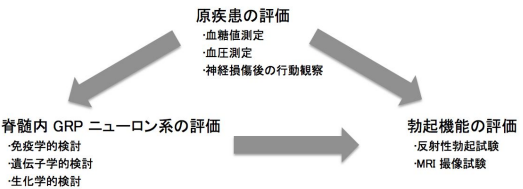
本研究では、内分泌性 血管性 神経障害性の3種類の異なる機序による勃起障害 (ED) モデルラットを対象とし、ED と脊髄内 GRP 系の関連性につき明らかにする事を目的とする。研究対象としては、内分泌性 ED モデルとしてストレプトゾトシン (streptozotocin: STZ) 腹腔内投与による糖尿病誘発ラット 血管性 ED モデルとして高血圧自然誘発ラット 神経障害性 ED モデルとして神経圧迫による神経損傷ラットをそれぞれ採用する。

それぞれのラットにおける病的状態を確認した後、反射性勃起試験により各々の勃起機能を定量化し、EDであることを確認する。続いて各個体の GRP ニューロンシステムに着目し、分子・神経解剖学的にその局在と役割について、詳細に検討する (Fig. 3・4)。

Fig. 3



Fig. 4



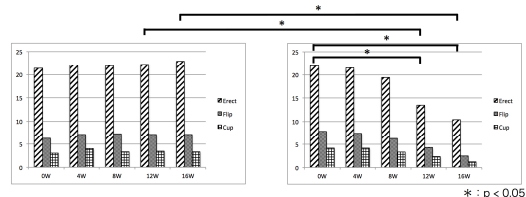
4. 研究成果

2012年春より実験を開始した。春期に基礎的実験を行い、夏期には共同研究を行っている岡山大学生窓実験所の協力のもと反射性勃起試験の基本的手技、GRP 免疫染色の基本的手技を修得した。

しかしながら、本実験において最も肝要である GRP 免疫染色に関して、自研究室で施行した再現実験の成功に至らず、実験に遅延を来した。再現が困難であった原因としては、免疫染色の細かい手技に研究室毎の齟齬があった点が第一に考えられ、結果としては詳細な手技に至るまで共同研究者と同様に行う事で、2012年度終盤に再現実験に成功し、その後、問題なく行える系を確立した。また、抗 GRP 抗体の染色性に関しては、新規購入分の染色性が非常に良好である事を確認済みである。

糖尿病性勃起障害モデルラットに対する性機能および脊髄内 GRP 発現解析の本実験に関しては2013年6月に対象群と糖尿病化群のいずれも 8 匹で開始した。実験計画に沿って環境馴化、開始時点での反射性勃起試験、ストレプトゾシン腹腔内注射による糖尿病化手技を施行、糖尿病化手技施行 1 週間経過時点での血糖値 300mg/dL を糖尿病化の Cut Off 値としたが、8 匹中の 1 匹が基準を満たさず、以降の実験は対象群と糖尿病化群のいずれも 7 匹で継続した。反射性勃起試験においては糖尿病化後 12 週時点で群間有意差および糖尿病化前後の有意差が出現、糖尿病化 16 週時点まで実験を継続したが 16 週後時点では高度の勃起障害を認める個体も確認出来た (Fig. 5)。よって糖尿病の反射性勃起に与える影響についての評価は十分に可能と判断し、全ラットの脊髄標本採取と切片作成、免疫染色へ移行した。

Fig. 5



その後の実験に時間を要する事が予想されたため、不凍液保存により長期保存可能とした。その後随時脊髄の免疫染色を施行しており現状で全切片中の 8 割の免疫染色が終了している。残る切片も早急に免疫染色を完遂し、画像解析と統計解析に以降する必要がある。

また、以降順次神経障害性、血管性の ED モデルラットの系に移行予定であるが、基本的手技については習得済みである事、実験器具や試薬については必要なものがほぼ全て購入済みである事より、予算の追加無くして予定の実験を完遂出来る見込みであ

る。

今後、本年中に 3 系統全ての実験を終了させ、論文執筆を開始、併せて本年度中の学会発表を視野に入れている。

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 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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内明宏 (KAWAUCHI AKIHIRO)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90240952

(2) 研究分担者

三木恒治 (MIKI TSUNEHARU)
京都府立医科大学・医学部・教授
研究者番号：10243239

邵仁哲 (SOH JINTETSU)
明治国際医療大学・医学部・教授
研究者番号：40305587

上田崇 (UEDA TAKASHI)
京都府立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50601598

(3)連携研究者
なし()
研究者番号: