



Protective effects of tadalafil against cisplatin-induced spermatogenic dysfunction

賀來, 泰大

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8479号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482227>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Protective effects of tadalafil against cisplatin- induced spermatogenic dysfunction

シスプラチン投与後の精巣障害に対するタダラフィルの保護効果の検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

腎泌尿器科学

(指導教員：黒田良祐教授)

賀来 泰大

概要

背景：シスプラチン（CDDP）は、膀胱がん、精巣がんなどの悪性腫瘍の治療に有効な抗がん剤であるが、CDDP 投与後の乏精子症や無精子症が臨床問題となることがある。CDDP が精巣毒性を引き起こす要因の一つとして、酸化ストレスによるものがある。タダラフィルは、前立腺肥大症や勃起不全の治療薬として臨床で広く用いられているが、抗酸化作用を示すことも報告されている。Rho-kinase α (ROCK2) は、細胞の遊走やアポトーシスに関与し、CDDP による腎毒性に関与していることが報告されており、ROCK2 の過剰発現は、酸化ストレスを引き起こすことが知られている。

目的：本研究の目的は、CDDP により引き起こされた精巣毒性に対し、タダラフィルに保護効果があるかどうか検証することである。

材料と方法：32 匹のラットを使用し、下記 4 群に振り分けた。

CONT グループ：Day1 生理食塩水腹腔内投与、Day1～10 DMSO+生理食塩水腹腔内投与。TAD グループ：Day1 生理食塩水腹腔内投与、Day1～10 タダラフィル (0.4mg/kg)+DMSO+生理食塩水腹腔内投与。CD グループ：Day1 CDDP (7mg/kg)+生理食塩水腹腔内投与、Day1～10 DMSO+生理食塩水腹腔内投与。CDT グループ：Day1 CDDP (7mg/kg)+生理食塩水腹腔内投与、Day1～10 タダラフィル (0.4mg/kg)+DMSO+生理食塩水腹腔内投与。

Day11 に麻酔下にラットの両側精巣、精巣上体を摘出し重量の評価を行った後、摘出した検体の精子所見、酸化ストレスマーカー測定、病理学的評価および qRT-PCR を行った。

結果：CDDP 投与により、精巣精巣上体重量の減少、精子所見の増悪、精細管の萎縮を認めた。また精細管のアポトーシス、酸化ストレス、ROCK2 mRNA の発現の増加が観察された。タダラフィルの投与により、これらの有害事象は軽減された。

結論：タダラフィルは、CDDP による造精機能障害を軽減する薬剤として期待できる。タダラフィルの抗酸化作用がこの現象の一因である可能性があり、ROCK2 と酸化ストレスマーカーはタダラフィルの抗酸化作用に関与している可能性がある。タダラフィルは、CDDP 投与後の造精機能障害を軽減するための治療オプションの 1 つとして考慮できる。

背景

シスプラチン（CDDP）は肺癌、頭頸部癌、卵巣癌、泌尿器領域では、膀胱癌や精巣癌など、多くの悪性腫瘍の治療に広く用いられている。しかし、治療後に腎毒性、血液毒性、心毒性、耳毒性、神経毒性、造精機能障害などの有害事象が発生することがある。精

巣癌は比較的若い患者に発症することが多く、CDDP 治療後の男性不妊症がしばしば臨床的に問題となる。ヒトおよび動物モデルでの研究により、CDDP の短期および長期投与は、精子形成の障害を引き起こすことが示されている。したがって、CDDP の精巣毒性を低減することは、男性不妊症のリスクを低減するために重要である。

CDDP による造精機能障害のメカニズムは完全には解明されていないが、精巣に酸化ストレスが生じることも一因と考えられている。さらに、DNA 損傷や炎症の誘発も、CDDP による造精機能障害に関与していると考えられている。したがって、抗酸化酵素は CDDP による造精機能障害を部分的に軽減する可能性があると考えられた。

タダラフィルはホスホジエステラーゼ (PDE) 5 阻害剤で、勃起不全 (ED) や前立腺肥大症の治療薬として泌尿器科臨床でよく使用されている。またタダラフィルは、その抗酸化作用により CDDP 誘発心毒性および腎毒性に対して保護効果を有することが報告されている。

CDDP による腎毒性では、細胞遊走やアポトーシスを制御する Rho-kinase α (ROCK2) がメカニズムの一つに関与していることが報告されている。Rho A/Rho-kinase 経路は、収縮、遊走、増殖、アポトーシスなど多くの細胞機能に重要な役割を果たしており、その過剰な活性は酸化ストレスを誘導することが知られている。脳再灌流障害モデルラットにおいて、ROCK 2 の発現が亢進し、インスリン抵抗性改善薬であるメトホルミンは ROCK2 の発現を抑制し、酸化ストレスを低減させたという報告がある。また、精索捻転モデルラットでは、捻転が酸化ストレス、アポトーシス、ROCK2 の発現上昇を引き起こし、ROCK2 の阻害剤である Y-27632 が精巣障害を改善したという報告がある。

CDDP による造精機能障害の原因の一つに酸化ストレスがあり、タダラフィルはその抗酸化力によって精巣保護作用を発揮する可能性がある。さらにこの経路に ROCK2 が関与している可能性を、今回ラットを用いて検討した。

方法

本研究では体重 200g~250g の 32 匹のラットを下記 4 群に分けた。

CONT グループ: Day1 生理食塩水腹腔内投与、Day1~10 DMSO+生理食塩水腹腔内投与。

TAD グループ: Day1 生理食塩水腹腔内投与、Day1~10 タダラフィル (0.4mg/kg)+DMSO+生理食塩水腹腔内投与。

CD グループ: Day1 CDDP(7mg/kg)+生理食塩水腹腔内投与、Day1~10 DMSO+生理食塩水腹腔内投与。

CDT グループ: Day1 CDDP(7mg/kg)+生理食塩水腹腔内投与、Day1~10 タダラフィル

(0.4mg/kg)+DMSO+生理食塩水腹腔内投与。

Day11 に麻酔下にラットの両側精巣、精巣上体を摘出し重量の評価を行った後、下記の評価を行った。

- ・精子所見

精巣上体頭部尾部を生理食塩水 1ml の中でそれぞれ 2 回、割を入れ 37°C で静置し、マクラチャンバーで精子濃度と運動率を評価した。

- ・病理学的検査

精巣を 10%ホルマリンで固定後パラフィンに包埋した。4 μ m にカットしヘマトキシリンエオジン(H&E)染色を行い、精巣の病理学的所見の評価と精細管短径を評価した。また Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay を行いアポトーシス細胞の検出を行った。

- ・酸化ストレスマーカー

酸化ストレスマーカーとして知られる MDA と SOD の精巣組織内濃度を、キットを使用して ELISA で評価した。

- ・qRT-PCR

ROCK2 の mRNA 発現レベルの定量化を qRT-PCR を用いて評価した。

結果

- ・精巣、精巣上体重量

CDDP 投与群 (CD および CDT) では、対照群 (CONT/TAD) に比べて有意に低かった ($P < 0.05$)。CD と CDT の比較では、精巣重量は CDT で有意に高かった ($P < 0.05$)。精巣上体についても同様であった。CONT と TAD の間では、精巣・精巣上体重量に有意な差はなかった。

- ・精子所見

CDDP 投与群の精子濃度および運動率は、CONT/TAD に比べ有意に低かった ($P < 0.05$)。シスプラチンと同時にタダラフィルを投与すると、CD と比較して精子濃度および運動率が有意に増加した ($P < 0.05$)。しかし、CDT と CONT/TAD の間にはまだ有意差があった。CONT と TAD の間には有意差はなかった。

- ・病理学的所見

H&E 染色により、CONT/TAD では精巣組織と精子形成は正常であったが、CD では精細管における上皮細胞の消失と空胞化、強いうっ血が観察された。CDT では CD に比べ、精細管の障害が軽減され、うっ血も改善されていた。

CDDP 投与 (CD および CDT) により、CONT/TAD と比較すると、より高度な精細管

萎縮を認めた ($P < 0.05$)。CDT では CD に比べ、精細管萎縮が軽度であった。CDT と CONT/TAD の比較で、精細管径に有意な差が認められたが CONT と TAD の間には有意差はなかった。

また TUNEL assay では CDDP 投与は TUNEL 陽性細胞率を増加させたが、タダラフィル投与を追加することで TUNEL 陽性細胞率を有意に減少させた ($P < 0.05$)。CONT 群と TAD 群の間に有意差はなかった。

・酸化ストレスマーカー

CD は CONT/TAD と比較して MDA が有意に増加し ($P < 0.05$)、CDT は CD と比較して MDA 量が有意に減少した ($P < 0.05$)。同様に、CD は CONT/TAD と比較して SOD レベルが有意に減少し ($P < 0.05$)、CDT は CD と比較して SOD レベルが有意に増加した ($P < 0.05$)。CDT と CONT/TAD の間には酸化ストレスマーカーに有意差はなく、CONT と TAD の間にも有意差はなかった。

・qRT-PCR

CDDP による精巣毒性に対するタダラフィルの保護効果に ROCK2 が関与していることを検討するために、精巣における ROCK2 の mRNA 発現量を調べた。CD では CONT/TAD 群に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。CDT では、ROCK2 mRNA の発現量は CD に比べ有意に低かった ($P < 0.05$)。CDT と CONT/TAD の間では、ROCK2 の発現量に有意差はなかった。CONT と TAD の間でも有意差はなかった。

考察

本研究では、CDDP 投与によって精巣の萎縮と精子所見の増悪を認めた。また、精上皮細胞の欠落、空胞化とうっ血、精細管の著しい萎縮が認められた。MDA の増加、SOD の減少、ROCK2 の mRNA 発現の亢進を認め、酸化ストレスマーカーやアポトーシス細胞の増加が見られた。タダラフィル投与は、CDDP による造精機能障害を改善し、酸化ストレスマーカーを減少させ、ROCK2 mRNA 発現を減弱させた。

これらの結果は CDDP によって誘発された精子形成不全がタダラフィルの保護効果により軽減されたことを支持するものである。CDT と CONT/TAD の間では、酸化ストレスマーカーや ROCK2 mRNA の発現に有意な差は認められなかった。しかし、造精機能障害(精子所見と精巣組織像の形態変化)については、CDT 群と CONT/TAD 群で有意差が残っていた。これは CDDP による造精機能障害には酸化ストレス以外の要因も関与していることを示唆している。ROCK2 mRNA の発現は、酸化ストレスマーカーの発現と同様であった。

本研究では、ROCK2 阻害剤を使用することで、経路の評価を代替できる可能性がある。しかし ROCK 阻害剤であるファスジルは普遍的に使用されていないのに対し、タダラ

フィルは泌尿器科臨床で広く使用されている。またタダラフィルは経口薬であり、投与も容易であるため、今回タダラフィルを選択した。

本研究の限界は、ラットを使用したモデルであるためヒトでの効果が確認できない点である。また、投与期間が10日間であり、長期の経過観察ができていない点である。さらにタダラフィルが ROCK2 mRNA 発現を減弱させる、あるいは寄与する機序は不明であり、今後の課題である。

結論

タダラフィルは、CDDP による造精機能障害を軽減する薬剤として期待できる。タダラフィルの抗酸化作用がこの現象の一因である可能性があり、ROCK2 と酸化ストレスマーカーはタダラフィルの抗酸化作用に関与している可能性がある。タダラフィルは、CDDP 投与後の造精機能障害を軽減するための治療オプションの1つとして考慮できる。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3222 号	氏 名	賀 来 泰 大
論 文 題 目 Title of Dissertation	<p>シスプラチン投与後の精巣障害に対するタダラフィルの保護効果の検討</p> <p>Protective effects of tadalafil against cisplatin-induced spermatogenic dysfunction</p>		
審 査 委 員 Examiner	<p>主 査 青 井 貴 之 Chief Examiner</p> <p>副 査 福 本 巧 Vice-examiner</p> <p>副 査 寺 井 義 人 Vice-examiner</p>		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

シスプラチン (CDDP) は肺癌、頭頸部癌、卵巣癌、泌尿器領域では、膀胱癌や精巣癌など、多くの悪性腫瘍の治療に広く用いられている。しかし、治療後に腎毒性、血液毒性、心毒性、耳毒性、神経毒性、造精機能障害などの有害事象が発生することがある。精巣癌は比較的若い患者に発症することが多く、CDDP 治療後の男性不妊症がしばしば臨床的に問題となる。ヒトおよび動物モデルでの研究により、CDDP の短期および長期投与は、精子形成の障害を引き起こすことが示されている。したがって、CDDP の精巣毒性を低減することは、男性不妊症のリスクを低減するために重要である。

CDDP による造精機能障害のメカニズムは完全には解明されていないが、DNA 損傷や炎症の誘発が CDDP による造精機能障害に関与していると考えられているほか、精巣に酸化ストレスが生じることも一因と考えられている。したがって、抗酸化物質は CDDP による造精機能障害を部分的に軽減する可能性がある。

タダラフィルはホスホジエステラーゼ (PDE) 5 阻害剤で、勃起不全や前立腺肥大症の治療薬として泌尿器科臨床で一般的に使用されている。さらに、タダラフィルはその抗酸化作用により CDDP 誘発心毒性および腎毒性に対して保護効果を有することが報告されている。

CDDP による腎毒性では、細胞遊走やアポトーシスを制御する Rho-kinase α (ROCK2) がメカニズムの一つに関与していると考えられている。Rho A/Rho-kinase 経路は、収縮、遊走、増殖、アポトーシスなど多くの細胞機能に重要な役割を果たしており、その過剰な活性は酸化ストレスを誘導することが知られている。脳再灌流障害モデルラットにおいては ROCK2 の発現が亢進しており、インスリン抵抗性改善薬であるメトホルミンが ROCK2 の発現を抑制し酸化ストレスを低減させたという報告がある。また、精索捻転モデルラットでは、捻転が酸化ストレス、アポトーシス、ROCK2 の発現上昇を引き起こし、ROCK2 の阻害剤である Y-27632 が精巣障害を改善したとの報告がある。

以上より、CDDP による造精機能障害の原因の一つに酸化ストレスがあり、タダラフィルはその抗酸化力によって精巣保護作用を発揮する可能性が考えられた。さらに、もし仮に精巣保護作用があるならば、その機序に ROCK2 が関与している可能性も考えられた。本研究で申請者らは、これらの可能性についてラットを用いて検討を行った。

ラットを4群(コントロール群、タダラフィル投与群、CDDP 投与群、CDDP+タダラフィル投与群)に分け、それぞれの精巣重量、精巣上体中の精子濃度、精巣組織像、酸化ストレスマーカー、ROCK2 mRNA 発現量を評価した。

CDDP 投与によって精巣の萎縮と精子所見の増悪を認めた。また、精上皮細胞の脱落、空胞化とうっ血、精細管の著しい萎縮が認められた。MDA の増加、SOD の減少、ROCK2 の mRNA 発現の亢進を認め、酸化ストレスマーカーやアポトーシス細胞の増加が見られた。タダラフィル投与は、CDDP による造精機能障害を改善し、酸化ストレ

スマーカーを減少させ、ROCK2 mRNA 発現を減弱させた。

これらの結果から申請者らは CDDP によって誘発された精子形成不全がタダラフィルの保護効果により軽減されたことを支持すると述べている。

本研究では投与および観察が短期間であり、また PDE5 阻害薬がどのように ROCK2 mRNA 発現に関与しているかが解明されていないという問題点がある。したがって長期投与における評価や PDE5 阻害薬と ROCK2 の関連については今後更なる検討がなされるべきであり、最適な投与量や投与経路の選択と言う課題も残る。とはいえ、CDDP 投与後男性不妊という比較的頻度の高い有害事象に対し日常臨床で使用されるタダラフィルが有用である可能性が申請者らによって示された。

本研究は、CDDP 投与後の造精機能障害に対するタダラフィルの効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。