

# 蓄尿障害に対する牛車腎気丸の治療効果の解明

山本 清司、波多野 紀行、鈴木 裕可  
(地域連携研究ユニット)

## 【背景と目的】

本邦において、60歳以上の約8割が何らかの下部尿路症状を呈するとの報告がある。下部尿路症状のうち、蓄尿症状は蓄尿機能の障害に起因し、頻尿、尿意切迫感、尿失禁といった症状を呈する。蓄尿症状を呈する過活動膀胱に対して、抗コリン薬やアドレナリン $\beta_3$ 受容体刺激薬などが薬物療法に使用されるが、症例によっては効果不十分な場合がある。牛車腎気丸は頻尿に対して保険適用されており、その有効性を示唆する報告が散見されるが、現状では分子レベルでの牛車腎気丸の作用機序の報告は限定的であり、さらには、その構成生薬や化合物単位での作用機序の報告はない。

膀胱上皮細胞においては、種々の受容体やイオンチャネルが膀胱内圧や温度、化学物質による刺激を感知し、引き続いて放出される種々のケミカルメディエーターが知覚神経終末に作用することで中枢へ尿意が伝達されることが報告されている。このように膀胱上皮は単なるバリアとして機能するだけでなく、排尿機能の調節にも寄与している。また、蓄尿障害の病態形成に、膀胱上皮細胞の刺激受容分子が寄与することが報告されている。

本研究では膀胱上皮細胞を用いて、蓄尿症状を呈する種々の病態に共通する炎症状態や線維化などを *in vitro* で再現し、種々の刺激受容分子の発現量変化に対する牛車腎気丸含有化合物の効果について検討した。また、過活動膀胱の病態時において、膀胱上皮層が過剰な機械刺激を受容している可能性を考え、膀胱上皮細胞における機械刺激受容チャネルの機能発現について検討した。

## 【方法】

膀胱上皮細胞として、ヒト膀胱癌（移行上皮癌）由来細胞株である T24 細胞を用いた。

T24 細胞に対し、炎症性サイトカイン Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を用い、いずれも 100 ng/mL の濃度で 24 時間曝露した。Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、5 ng/mL の濃度で 24 時間曝露し、それぞれのサンプルから RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成した。それらの cDNA を用いて、リアルタイム PCR 法により各種刺激受容分子の mRNA 発現量変化について検討した。次に、mRNA 発現量の変化が確認された分子に対する牛車腎気丸の作用について検討を行った。牛車腎気丸に含まれる代表的化合物であるロガニン (10  $\mu$ M)、シンナムアルデヒド (10  $\mu$ M)、モロニシド (10  $\mu$ M)、ペオニフロリン (100  $\mu$ M) を、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、あるいは TGF- $\beta$  曝露の 30 分前に T24 細胞に前処置し、cDNA サンプルを作成した。それらの cDNA サンプルを用いて、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  による mRNA 発現量変化に対する牛車腎気丸含有成分の作用について検討を行った。T24 細胞における機械刺激受容チャネルの mRNA 発現については、リアルタイム PCR 法により検討した。また、機械刺激受容チャネルのチャネル機能については、T24 細胞にメカニカルストレスの負荷あるいは機械刺激受容チャネル活性化薬を添加し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を測定することにより検討した。

## 【結果と考察】

T24 細胞において、TNF- $\alpha$  刺激群では、IL-6、IL-8 の発現量の上昇がみられた。また、

P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub>受容体、アドレナリンβ<sub>3</sub>受容体、transient receptor potential (TRP) チャネルのうち TRPM7 および Piezo1 チャネルの発現量の上昇がみられ、TRPM8、および、カルシウム活性化カリウムチャネルのうち SK4 チャネルの発現量の減少がみられた。また、IL-1β刺激群では、IL-6、IL-8 の発現量の上昇がみられた。また、P2Y<sub>6</sub>受容体、SK2 および SK3 チャネルの発現量の上昇がみられ、P2X<sub>1</sub> 受容体および SK4 チャネルの発現量の減少がみられた。IL-1β刺激群および TNF-α刺激群において、いずれも対照群に比べ、炎症状態が再現されたと考えられ、また、SK4 チャネルの発現量の減少がみられた。このことから、膀胱における炎症状態では、膀胱上皮細胞における SK4 チャネルの発現量の減少が病態に関与している可能性が示唆された。そして、TNF-α刺激による IL-6、IL-8 の発現量の上昇、および、SK4 チャネルの発現量の減少に対する牛車腎気丸の代表的化合物 4 種の抑制効果はみられなかった。

TGF-β刺激群では、collagen 1a1、collagen 1a2、collagen 4a1 の mRNA 発現量の上昇がみられた。また、抗 collagen I 抗体を用いた免疫染色法により、TGF-β刺激群において collagen I の発現増加が認められ、TGF-β刺激による T24 細胞の線維化が確認された。TGF-β刺激による各種刺激受容分子の mRNA 発現量変化について検討した結果、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub> 受容体の mRNA 発現量の上昇がみられ、SK4 チャネルの mRNA 発現量の減少がみられた。しかし、これらの mRNA 発現量変化に対する 4 種の牛車腎気丸含有化合物の作用は観察できなかった。

T24 細胞において、炎症刺激または線維化刺激することにより、共通して SK4 の mRNA 発現量が減少したことから、膀胱における病態に SK4 が何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

過活動膀胱罹患患者では、膀胱上皮層に過剰なメカニカルストレス (MS) が負荷されており、この過剰な MS が過活動膀胱の増悪に寄与する可能性が示唆されている。そこで、T24 細胞における MS 負荷による細胞機能変化について、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定法を用いて検討した。T24 細胞に 10.6 μL/s の水流刺激 (MS) を負荷すると、一過性の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観察された。その MS 惹起細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は細胞外液の Ca<sup>2+</sup>を除去することにより完全に消失した。T24 細胞における MS 受容分子を同定する目的で MS 受容候補分子の mRNA 発現量解析を行った結果、機械刺激受容チャネルである Piezo1 の mRNA が豊富に発現していることが明らかになった。そこで T24 細胞に Piezo1 活性化薬 Yoda-1 を添加すると細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、その細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は Piezo1 を標的とした siRNA (siPiezo1) 処置により抑制された。よって、T24 細胞において Piezo1 が機能発現していることが明らかになった。MS 負荷による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇についても Piezo1 ノックダウンにより抑制されたことから、T24 細胞における MS 負荷による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇には Piezo1 の活性化が寄与することが明らかになった。

#### 【今後の研究方針】

今後は、ヒト初代培養膀胱平滑筋細胞およびヒト初代培養膀胱上皮細胞を用い、病態を再現した条件下での各種標的分子の発現量解析および機能解析を行う。また、SK4 チャネルの開孔薬や阻害薬を用いた、上皮細胞における SK4 チャネルの膀胱機能への寄与の検討、および、牛車腎気丸に含まれる主要成分の SK4 チャネルの機能に対する検討を行う。これらの検討を行うことによって、牛車腎気丸の蓄尿障害に対する治療効果の解明につなげたい。