

# 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。

膀胱平滑筋細胞においては、種々の受容体やイオンチャネルが神経終末や膀胱上皮から放出される種々の生理活性物質などの刺激を受け、直接的に収縮が惹起される。また、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生理活性物質が知覚神経終末や平滑筋に作用することで中枢へ尿意の伝達や排尿筋の収縮が起こることが報告されている。そして、蓄尿障害の病態形成に、膀胱平滑筋細胞や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、膀胱平滑筋細胞および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、膀胱上皮層における病態へ寄与する分子の機能発現について検討した。

## 【方法】

ヒト初代培養膀胱平滑筋細胞およびヒト膀胱癌（移行上皮癌）由来細胞株である T24 細胞を用い、1 mg/mL の牛車腎気丸で 30 分間前処理し、炎症性サイトカイン Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) あるいは Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を添加し 24 時間作用させた（いずれも最終濃度 100 ng/mL）。また、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) については、5 ng/mL の濃度でヒト初代培養膀胱平滑筋細胞では 72 時間、T24 細胞では 24 時間作用させた。その後 total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製した。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。

また T24 細胞における機械刺激誘発 ATP 分泌については、T24 細胞に進展刺激を負荷し、培地中に放出された ATP 濃度を測定することにより検討した。T24 細胞における P2Y 受容体の機能発現については、アゴニストまたはアンタゴニストを用い、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。T24 細胞および膀胱平滑筋細胞の collagen I 発現量については、抗 collagen I 抗体を用いた細胞免疫染色法により検討した。

## 【結果と考察】

### 結果① 炎症性サイトカイン刺激に対する牛車腎気丸の効果

T24 細胞において、TNF- $\alpha$ 刺激により発現量の上昇がみられた IL-6、IL-8、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub> 受容体、transient receptor potential (TRP) チャネルのうち TRPM7 および Piezo1 チャネル、また、発現量の減少がみられた SK4 チャネルに対する牛車腎気丸の抑制効果はみられなかった。IL-1 $\beta$ 刺激により発現量の上昇がみられた IL-6、IL-8、P2Y<sub>6</sub>、SK2、SK3 チャネル、ま

た、発現量の減少がみられた SK4 チャンネルに対する牛車腎気丸の抑制効果はみられなかった。

膀胱平滑筋細胞において、TNF- $\alpha$ 刺激により発現量の上昇がみられた IL-6、IL-8、P2X<sub>1</sub>、P2Y<sub>6</sub> 受容体、TRPA1 チャンネルおよび Piezo1 チャンネルに対する牛車腎気丸の抑制効果はみられなかった。また、IL-1 $\beta$ 刺激により発現量の上昇がみられた IL-6、IL-8、P2X<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub> 受容体に対する牛車腎気丸の抑制効果はみられなかった。

## 結果② TGF- $\beta$ 誘発線維化に対する牛車腎気丸の効果

T24 細胞を TGF- $\beta$ で刺激することにより collagen 1a1、collagen 1a2、collagen 4a1 の mRNA 発現量の顕著な増加が観察された。また抗 collagen I 抗体を用いた細胞免疫染色により、TGF- $\beta$ 刺激群において collagen I 蛋白質の発現増加についても観察された。これらの結果より、TGF- $\beta$ 刺激は T24 細胞を線維化させることが確認された。TGF- $\beta$ 刺激による collagen 1a2、collagen 4a1 の mRNA 発現量の上昇は、牛車腎気丸添加により有意に抑制された。この結果は、牛車腎気丸が膀胱上皮の線維化を一部抑制する可能性を示唆している。

次に TGF- $\beta$ 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。その結果、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub> 受容体の mRNA 発現が増加することが明らかになった。そこで、T24 細胞においてプリン受容体の mRNA 発現分布について検討した。その結果、P2X<sub>2</sub>、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub>、P2Y<sub>14</sub> 受容体の mRNA 発現量が豊富に発現していることが確認された。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定法を用いて、T24 細胞において機能発現しているプリン受容体のサブタイプ解析を実施した。その結果、T24 細胞では P2Y<sub>2</sub> 受容体が主に機能発現しており、細胞外における ATP および UTP 刺激により細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を誘発することが明らかになった。また、TGF- $\beta$ 刺激した T24 細胞群では、ATP による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇における最大反応の上昇および感受性の増加 (EC<sub>50</sub> の低下) が観察された。これらの結果は、線維化した膀胱上皮では ATP に対する感受性が増加することを示唆しており、この ATP 感受性増加が過活動膀胱の病態に寄与する可能性がある。しかしながら、牛車腎気丸はこの TGF- $\beta$ 刺激による P2Y<sub>2</sub> 受容体 mRNA 発現量の増加を抑制しなかった。

線維化した膀胱上皮では ATP の感受性が高まる可能性が示唆されたことから、膀胱上皮刺激因子としての ATP に着目した。ATP の分泌源としては交感神経終末がよく知られているが、膀胱上皮細胞自身も ATP を分泌することが報告されている。そこで、T24 細胞における ATP 分泌について検討を行った。T24 細胞を専用のチャンバーに播種し、機械刺激(伸展刺激)を負荷すると ATP の分泌量が有意に増加した。この機械刺激誘発 ATP 分泌に対する TGF- $\beta$ 刺激の影響について検討したが、ATP 分泌量はまったく変化しなかったため、TGF- $\beta$ 刺激による P2Y<sub>2</sub> 受容体の発現増加は機械刺激誘発 ATP 分泌に寄与しないと考えられた。

最後に膀胱平滑筋線維化に対する牛車腎気丸の作用について検討した。初代培養ヒト膀胱平滑筋細胞を TGF- $\beta$ で刺激することにより collagen I 蛋白質の発現増加が観察され、線維化が確認された。そこで、この TGF- $\beta$ 刺激による膀胱平滑筋線維化に対する牛車腎気丸の作用について検討した。TGF- $\beta$ 刺激による各種 collagen の mRNA 発現上昇は、牛車腎気丸の添加により抑制されなかった。また、TGF- $\beta$ 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、アセチルコリン M<sub>3</sub> 受容体、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub> 受容体、transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) mRNA の発現増加、TRPA1 mRNA の発現減少が観察された。しかし、牛車腎気丸はこれらの mRNA 発現量変化に対して影響を及ぼさなかった。

### 【今後の研究方針】

本研究では、作用点の解明には至らなかったが、詳細な条件検討等を行い、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。