

消化管生理学分野 Division of Gastrointestinal Pathophysiology

教授 門脇 真 Professor Makoto Kadowaki (Ph.D.)

助手 山本 武 Assistant Professor Takeshi Yamamoto (Ph.D.)

研究目的 Aims of the research projects

消化管疾患，特に腸管免疫性疾患の病因および病態形成機序を解明し，それに基づき和漢薬等を含めた新規治療薬の創出を目指す。

研究概要 Research projects

消化管は機能性疾患が多く，不定愁訴が多岐にわたるため疾患が特定しにくい領域であり，現代医学のなかでも和漢薬治療が多く取り入れられている領域であります。このような疾患に対し，西洋医学的治療では薬理学的メカニズムの明らかな単剤を胃，小腸または大腸など部位を特定して用いる場合が多いですが，和漢薬治療では，消化管全体を生命活動の原動力となる“気”を生み出す一つのシステムと考え，西洋医学的発想にはない“消化管全体の機能を高める”ことにより不定愁訴を軽減するという統合的な考え方があります。そのためには，消化管疾患に対する十分な知識と経験が必要であり，基礎的な病態生理学的，薬理学的研究もちろん不可欠であります。西洋薬，和漢薬にはそれぞれに特徴があり，相反させることなく両者の特長を活かして薬物治療にあたることにより，さらに治療域を広げることも重要であると考えています。

消化管生理学分野では，近年患者が急増してきている腸管免疫性疾患すなわち炎症性腸疾患(IBD)の潰瘍性大腸炎，さらに食物アレルギーを対象疾患として考えています。若年層を中心に患者が急増している潰瘍性大腸炎は，厚生労働省の特定疾患に指定されている慢性で難治性の疾患であります。腸管での免疫異常を背景とするIBDに対しては，近年の粘膜免疫学の発展を背景に，精力的な免疫学的病態研究にもかかわらず，その病因や遷延化因子などはいまだ不明であり，したがって病態を基盤とした治療法は確立されていません。また，食物アレルギーは腸管粘膜免疫機構の未熟な小児にその頻度が高く，小児の肉体的精神的発育への影響は重大であり，さらに，いわゆる「アレルギーマーチ」の引き金としても今やその解明と対策は急務であります。未だ充分な病態生理学的解明はなされていません。

全身免疫系では神経系さらには内分泌系との間に密接な強いクロストークが明らかにされていますが，腸管では粘膜免疫系組織が集積する粘膜固有層を中心に密な神経線維の存在が知られているにもかかわらず，粘膜免疫系，腸管神経系，消化管内分泌系などで構成される「腸管イントラネット」という統合的考え方からの研究は世界的にも始まったばかりであります。したがって，「腸管イントラネット」の破綻という観点から，腸管疾患の病因，病態に迫る研究はほとんどなされていません。

消化管生理学分野ではこの点に着目し，自律神経系・腸管神経系やリンパ球・マクロファージ・肥満細胞などの粘膜免疫系と腸管免疫性疾患の病因，病態との関連を，機能的側面のみならず形態的側面からも解明することを目的としています。特に，その病態生理的役割が明らかになりつつあるTRPV1を持つ腸管求心性知覚神経，神経系と免疫系の接点と考え始められたニコチン受容体を介するコリン性抗炎症・免疫機構およびPPAR γ を介する抗炎症・免疫機構などの役割の解明を目指して，遺伝子改変動物(PPAR γ ノックアウトマウス，消化管肥満細胞のみが欠損することが見出されたPI3-キナーゼ欠損マウスなど)などを用いた新しい腸管免疫性疾患の病態モデルを確立して病態生理学的解明を行い，さらに和漢薬を含めた新規特異的治療薬を創出することを目指しています。

◇原著

- 1) **Ishikawa T., Nakayama S., Nakagawa T., Horiguchi K., Misawa H., Kadowaki M., Nakao A., Inoue S., Komuro T. and Takaki M.: Characterization of in vitro gutlike organ formed from mouse embryonic stem cells. *American Journal Physiology-Cell Physiology*, 286:1344-1352, 2004.**

Abstract: Using an embryoid body (EB) culture system, we have made a functional organlike cluster: the "gut" from embryonic stem (ES) cells (ES gut). There are many types of ES clusters, because ES cells have a pluripotent ability to develop into a wide range of cell types. Before inducing specific differentiation by exogenously added factors, we characterized comprehensive physiological and morphological properties of ES guts. Each ES gut has a hemispherical (or cystic) structure and exhibits spontaneous contractions [mean frequency: 13.5 +/- 8.8 cycles per min (cpm)]. A dense distribution of interstitial cells of Cajal (ICC) was identified by c-Kit immunoreactivity, and specific subcellular structures of ICC and smooth muscle cells were identified with electron microscopy. ICC frequently formed close contacts with the neighboring smooth muscle cells and occasionally formed gap junctions with other ICC. Widely propagating intracellular Ca(2+) concentration oscillations were generated in the ES gut from the aggregates of c-Kit immunopositive cells. Plateau potentials, possibly pacemaker potentials in ICC, and electrical slow waves were recorded for the first time. These events were nifedipine insensitive, as in the mouse gut. Our present results indicate that the rhythmic pacemaker activity generated in ICC efficiently spreads to smooth muscle cells and drives spontaneous rhythmic contractions of the ES gut. The present characterization of physiological and morphological properties of ES gut paves the way for making appropriate models to investigate the origin of rhythmicity in the gut.

- 2) **Ogura Y., Suruga K., Mochizuki H., Yamamoto T., Takase S. and Goda T.: Postnatal changes in gene expression of retinal dehydrogenase and retinoid receptors in liver of rats. *Life Sciences*, 74:1519-1528, 2004.**

Abstract: Retinoic acid (RA) plays important roles in cellular differentiation and proliferation in various tissues including the liver. To explore a possible role of RA in the postnatal development of hepatic function, we analyzed RA-generation enzyme activity and the RA-related hepatic gene expressions in the suckling and weaning rats. At 5 days after birth, retinal dehydrogenase (RALDH) activity in the liver was relatively high. Its activity decreased by 70% until day 17, and then it gradually increased to a high level by the completion of weaning period. Northern blot analysis showed that RALDH2 mRNA levels decreased in the suckling period, whereas RALDH1 mRNA levels increased in the weaning period. Retinoid X receptor alpha (RXRalpha) mRNA levels increased in the suckling period and attained to a higher level at 17 days after birth. Retinoic acid receptor alpha (RARalpha) mRNA level showed only a slight and temporary increase on day 13. The mRNA levels of hepatocyte nuclear factors (HNF-4 and HNF-1alpha) exhibited parallel increases around suckling-weaning period, and the transcript levels of albumin, a typical target gene of the hepatocyte nuclear factors, increased during the suckling-weaning transition period. Electrophoretic mobility shift assay using a putative nuclear receptor-binding element on rat HNF-1 alpha gene revealed that HNF-4 homodimer, but not RXRalpha homodimer, bound to this element. These results suggest that postnatal expressions of hepatocyte-specific genes might be up-regulated by retinoid receptors, which may be related with the alterations of RALDH expression during postnatal development in the liver.

- 3) **Kuramoto H., Oomori Y., Murabayashi H., Kadowaki M., Karaki S., and Kuwahara. A.: Localization of neurokinin 1 receptor (NK1R) immunoreactivity in rat esophagus. *Journal of Comparative Neurology*, 478:11-21, 2004.**

Abstract: The aim of the present immunohistochemical study was to investigate the localization of neurokinin 1 receptor (NK1R) in rat esophagus and examine the relationship between NK1Rs and intrinsic cholinergic, nitrergic, or

substance P (SP) neurons. NK1R immunoreactivity (IR) was observed on the nerve cell bodies in the myenteric ganglia throughout the esophagus, but not on striated muscles and smooth muscle cells of the muscularis mucosae. The frequency of occurrence of NK1R neurons was highest in the cervical esophagus and lowest in the lower thoracic esophagus. Considerable immunoreactivity was seen on the nerve cell surfaces and was also present in the cytoplasm of cell somas and in the initial part of the axons, but not in any other nerve fibers or terminals. Dogiel type I-like morphology was observed in some of the NK1R neurons; however, the majority exhibited polymorphic morphology. Double immunolabeling indicated that a majority (77%) of the NK1R neurons were immunoreactive for choline acetyltransferase (ChAT), while a minority (23%) were immunoreactive for nitric oxide synthase (NOS)-IR. Most of the NK1R neurons (92%) were innervated by the SP nerve fibers. Triple immunolabeling indicated that 70% of the NK1R neurons were associated with intrinsic SP nerve fibers (without CGRP-IR), 59% were associated with extrinsic SP nerve fibers (with CGRP-IR), and 35% were associated with both intrinsic and extrinsic SP nerve fibers. These results suggest that SP/tachykinin released from the SP nerve fibers of intrinsic and/or extrinsic origin activates the predominantly intrinsic cholinergic neurons via NK1Rs to influence neuronal transmission or motility in rat esophagus.

4) **Kadowaki M., Kuramoto H. and Takaki M.: Combined determination with functional and morphological studies of origin of nerve fibers expressing transient receptor potential vanilloid 1 in the myenteric plexus of the rat jejunum. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*, 116:11-18, 2004.**

Abstract: The aim of this study was to determine the action of capsaicin in isolated rat intestine and the origin of nerve fibers expressing transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1: capsaicin receptor) in the rat jejunum by combination of functional and immunohistochemical experiments. Capsaicin (1 microM) produced a prolonged relaxation response (52. +/-15.3% of the relaxation response to papaverine, mean +/- S.D., n=27) of the isolated jejunum in the presence of atropine and guanethidine. Pretreatment with the TRPV1 antagonist, capsazepine (10 microM) and ruthenium red (3 microM) significantly reduced the relaxation response to capsaicin by 78% (P<0.01) and 38% (P<0.05), respectively. Tetrodotoxin and calcitonin gene-related peptide (CGRP)-desensitization significantly reduced the response to capsaicin by 72% (P<0.01) and 42% (P<0.01), respectively. Therefore, we investigated the distribution of TRPV1-immunoreactivity (IR) in the myenteric plexus of the rat jejunum. Using antisera raised against either the N-terminal or C-terminal domains of rat TRPV1, TRPV1-IR was present in the nerve fibers, but not in the cell bodies of myenteric neurons. These TRPV1-immunoreactive nerve fibers were running in myenteric ganglia and their interconnecting strands. Most TRPV1-immunoreactive nerve fibers showed CGRP-IR, whereas few VR1-immunoreactive nerve fibers showed substance P-IR. After chronic denervation of the extrinsic nerve supply to the jejunum, both the relaxation response to capsaicin and TRPV1-immunoreactive nerve fibers completely disappeared. These findings indicate that these TRPV1-immunoreactive nerve fibers in the rat jejunum derive from extrinsic neurons and that activation of TRPV1 produces the relaxation response in the rat jejunum, at least in part, through the release of CGRP from nerve fibers expressing TRPV1.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) 山本 武, 中居万寿美, 瓦林真実, 山口範晃, 高瀬幸子, 大浦昭寛, 松本信助, 大保稲實: 後期産卵鶏のマルチツール摂取によるニワトリ卵殻及び大腿骨, 脛骨のカルシウム強化. 第58回日本栄養・食糧学会大会, 2004, 5/21-23, 宮城.
- 2) 高瀬幸子, 瓦林真実, 山本 武: ニワトリヒナ発達過程の肺βカロテン開裂酵素遺伝子発現とハイドロコルチゾンの関与. 第58回日本栄養・食糧学会大会, 2004, 5/21-23, 宮城.
- 3) 山口範晃, 山本 武, 高瀬幸子: ニワトリβカロテン開裂酵素遺伝子発現とハイドロコルチゾン投与の影響. 第58回日本栄養・食糧学会大会, 2004, 5/21-23, 宮城.

- 4) 山本 武, 高瀬 幸子: ニワトリヒナ発達過程に肺 β カロテン開裂酵素遺伝子発現. 第56回日本ビタミン学会, 2004, 5/28-29, 新潟.
- 5) Takase S., Ogura Y., Suruga K., Mochizuki H., Yamamoto T. and Goda T.: Postnatal Changes in Gene Expression of Retinal Dehydrogenase and Retinoid Receptors in Liver of Rats. 2004 FASEB Summer Research Conferences "RETINOIDS" 2004, 6/12-17, Callaway Gardens Resort Pine Mountain, GA USA.
- 6) Kuramoto H. and Kadowaki M.: Immunohistochemical features of calbindin immunoreactive neurons in the rat esophagus. 16th International Congress of International Federation of Associations of Anatomists. 2004, 8/22-27, Kyoto.
- 7) 山口範晃, 山本 武, 高瀬幸子: ニワトリ小腸・肝臓の β カロテン開裂酵素: 発達過程における遺伝子発現変動及び雌雄の差. 第18回カロテノイド研究談話会, 2004, 9/-10, 神戸.
- 8) 山口範晃, 山本武, 高瀬幸子: ニワトリ小腸・肝臓の β カロテン開裂酵素: 発達過程における遺伝子発現とレチノイン酸シグナリングとの関連. 日本レチノイド研究会第15回学術集会, 2004, 11/18-19, 東京.

◇その他

- 1) 高瀬幸子, 四童子好廣, 山本武: 小腸における β カロテン代謝調節のメカニズム究明. 平成13年度シーボルト大学共同教育研究報告書, 2004, 3.
- 2) 高瀬幸子, 山本武, 四童子好廣, 大浦昭寛, 大保稲實, 松本信助, 三浦昭彦, 井上昭芳: マルチトール摂取によるニワトリ卵殻のカルシウム強化に関する研究. 平成14年度シーボルト大学共同教育研究報告書, 2004, 3.
- 3) 藏本博史, 門脇 真: 食道内在神経と迷走神経副交感神経線維の関係. 第1回 Enteric Nervous System 研究会, 2004, 10/30, 京都.
- 4) 門脇 真: 腸管免疫性疾患と腸管神経系. 第1回 Enteric Nervous System 研究会, 2004, 10/30, 京都.
- 5) 門脇 真: 教官はたのし 患者に喜ばれる新薬を 北日本新聞, 2004, 8/30.

◇共同研究

国内

- 1) 藏本博史: 京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科細胞機能学分野,
「腸管神経系における迷走神経(副交感神経)線維の神経支配に関する研究」
「腸管知覚神経の形態学的研究」
「腸管神経系とセロトニン含有腸クロム親和性細胞及びマスト細胞のクロストークに関する神経科学的研究」
2004, 5~
- 2) 門脇 孝: 東京大学大学院医学系研究科代謝栄養病態学(糖尿病・代謝内科)
「潰瘍性大腸炎の病態形成における神経型ニコチン受容体を介する抗炎症免疫機構の役割: PPAR γ ヘテロ欠損マウスを用いた新規病態モデルでの検討」
「腸管自律神経系と腸管肥満細胞の機能形態的關係が潰瘍性大腸炎の病態形成に果たす役割: 腸管肥満細胞特異的欠損マウスを用いての検討」
「食物アレルギー病態モデルによるアレルギー機序の解析: 腸管肥満細胞特異的欠損マウスを用いての検討」
2004, 7~
- 3) 小安重夫: 慶応義塾大学医学部免疫学
「腸管自律神経系と腸管肥満細胞の機能形態的關係が潰瘍性大腸炎の病態形成に果たす役割: 腸管肥満細胞特異的欠損マウスを用いての検討」

「食物アレルギー病態モデルによるアレルギー機序の解析：腸管肥満細胞特異的欠損マウスを用いた検討」

2004, 7～

◇研究費取得状況

- 1) 平成16年度 日本学術振興会科学研究補助金 基盤研究C(2) (代表：門脇 真)「食物アレルギーと腸管免疫性疾患：特に腸管求心性知覚神経の役割について」
- 2) 平成16年度 日本学術振興会科学研究補助金 基盤研究C(2) (分担：門脇 真)「下部食道括約筋におけるキャプサイシン感受性知覚神経の抑制反射機構」
- 3) 平成16年度 財団法人喫煙科学研究財団 (代表：門脇 真)「腸管粘膜免疫系および腸管神経系と潰瘍性大腸炎の病因，病態との関連：特に $\alpha 7$ 型ニコチン受容体を介するコリン性抗炎症・免疫機構およびPPAR γ を介する抗炎症・免疫機構の破綻」
- 4) 平成16年度 富山医科薬科大学学内競争的研究補助金 「戦略的経費」(代表：門脇 真)「潰瘍性大腸炎の病態形成機序における神経型ニコチン受容体を介するコリン性抗炎症免疫機構の役割：PPAR γ ヘテロ欠損マウスを用いた新規病態モデルでの検討とそれに基づく和漢薬を中心とした治療薬探索」
- 5) 平成16年度 富山医科薬科大学学内競争的研究補助金 「戦略的経費」(代表：山本 武)「食物アレルギー性下痢誘発モデルマウスによるアレルギー機序の解析」

◇研究室在籍者

学部3年生：宇都宮菜穂，兒玉利尚