

## 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.)
助手	影山 夏子	Assistant Professor	Natsuko Kageyama (Ph.D.)

### ◇研究目的

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

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る。そのため、現代医学のなかでは、漢方薬による治療が一般臨床において比較的多く取り入れられている領域となっている。このような疾患に対し、西洋医学的治療は、多くの場合、薬理学的メカニズムが明らかな単一化合物を症状の原因となっていると考えられる胃、小腸あるいは大腸など部位を特定して用いる。一方、漢方薬による治療は、現代の薬理学的な詳細なメカニズムは明らかにされていないものの、経験的に明らかな事実を根拠としたり、西洋医学的な発想とは異なった発想、すなわち「消化管全体を生命活動の原動力となるエネルギー（気）を生み出すシステムとして捉え、そのバランス調整により治療効果を期待する」という発想を用いて行われる。西洋薬、漢方薬にはそれぞれ特徴があり、対立させることなく両者の長を生かして治療に当たることが、治療域をさらに広げることへとつながる重要なことと考えている。

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及び食物アレルギーを対象疾患としている。近年、患者が急増している炎症性腸疾患は、厚労省の特定疾患に指定されている慢性で難治性の腸管免疫性疾患である。腸管での免疫異常を背景とする炎症性腸疾患に対して、近年の粘膜免疫学の発展を背景に精力的な研究が展開されているにもかかわらず、その病因や病態形成メカニズムなどは未だ不明であり、従って治療薬や治療法は確立されていない。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病因・病態形成機序の解明と対策は急務であるが、未だ十分な解明はなされていない。

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る。一方、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、腸管の神経系、免疫系、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、「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・病態に迫る研究は殆んどなされていない。

消化管生理学分野では、この点に着目し「腸管イントラネット」と腸管免疫性疾患の病因・病態との関連を、病態生理学的、分子生物学的、神経科学的及び形態学的に解明することを目的としている。そのために、腸管免疫性疾患の有用な病態モデルを確立し、遺伝子改変動物（PPAR $\gamma$ ノックアウトマウス、PI3-キナーゼノックアウトマウスなど）なども用いて、特に神経系と免疫系の接点と考えるニコチン受容体を介するコリン性抗炎症・免疫機構及びPPAR $\gamma$ を介する抗炎症・免疫機構などの病態生理学的役割を解明することを目的に研究を展開している。さらに、これらの基礎的研究を基盤として、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る。特に、漢方薬にはこれら腸管免疫性疾患に対して有効例が報告されているにもかかわらず、

治療効果を示す作用機序などの科学的研究はこれまで殆んどされていない。そこで、確立した病態モデルを用いて漢方薬の詳細な作用機序の解明を目指している。

#### ◇原著論文

1) **Kuramoto H., and Kadowaki M.: Vagal nerve stimulation preferentially induces Fos expression in NOS-positive neurons in the rat esophagus.**

**Cell & Tissue Research 324: 361-367, 2006.**

**Abstract:** To identify neurochemical phenotypes of esophageal myenteric neurons synaptically activated by vagal preganglionic efferents, we immunohistochemically detected the expression of Fos, an immediate early gene product, in whole-mount preparations of the entire esophagus of rats following electrical stimulation of the vagus nerves. When electrical stimulation was applied to either the cervical left (LVN) or right vagus nerve (RVN), neurons with nuclei showing Fos immunoreactivity (IR) were found to comprise approximately 10% of the total myenteric neurons in the entire esophagus. These neurons increased from the oral toward the gastric end of the esophagus, with the highest frequency in the abdominal portion of the esophagus. A significant difference was not found in the number of Fos neurons between the LVN-stimulated and RVN-stimulated esophagus. Double-immunolabeling showed that nitric oxide synthase (NOS)-IR occurred in most (86% and 84% in the LVN-stimulated and RVN-stimulated esophagus, respectively) of the Fos neurons in the entire esophagus. Furthermore, the stimulation of either of the vagus nerves resulted in high proportions (71%-90%) of Fos neurons with NOS-IR, with respect to the total Fos neurons in each segment, in the entire esophagus. However, a small proportion (8% and 7% in the LVN-stimulated and RVN-stimulated esophagus, respectively) of the Fos neurons in the esophagus exhibited choline acetyltransferase (ChAT)-IR. The occurrence-frequency of Fos neurons with ChAT-IR was less than 4% of the total Fos neurons in any segment of the LVN-stimulated and RVN-stimulated esophagus. Some of the Fos neurons with ChAT-IR appeared to be innervated by numerous varicose ChAT-positive nerve terminals. The present results showing that electrical stimulation of the vagus nerves induces a high proportion of Fos neurons with NOS-IR suggests the preferential activation of NOS neurons in the esophagus by vagal preganglionic efferents. This connectivity between the vagal efferents and intrinsic nitrenergic neurons might be involved in inhibitory actions on esophageal motility.

2) **Kuramoto H., Kadowaki M., Yamamoto T., and Kuwano R.: Calbindin is predominantly expressed in nitrenergic neurons in rat esophagus.**

**Neuroscience Letters 401: 174-177, 2006.**

**Abstract:** We used immunohistochemistry to investigate the colocalization pattern of calbindin D28k (Calb) with nitric oxide and acetylcholine in myenteric neurons in the rat esophagus and compared it to that in the ileum or distal colon. The proportion of Calb-immunoreactive (IR) neurons to the total neurons in the esophagus (8%) was lower than that in the ileum (38%) or distal colon (27%). A majority (84%) of the esophageal Calb-IR neurons were uniaxonal neurons. On the other hand, 88% and 66% of Calb-IR neurons in the ileum and distal colon, respectively, had Dogiel type II morphology, while most of the others were Dogiel type I neurons. Double immunolabeling indicated that most (87%) of the esophageal Calb-IR neurons were nitric oxide synthase (NOS) positive and a minority (21%) were choline acetyltransferase (ChAT) positive. Most (93% and 89%, respectively) of the Calb-IR neurons in the ileum and distal colon showed ChAT immunoreactivity and only a small number exhibited NOS immunoreactivity in the ileum and distal colon. In the esophagus, some of Calb-IR nerve endings surrounding the myenteric neurons were NOS positive, but no Calb immunoreactivity was found on the motor endplates of the striated muscles. Therefore, the present study revealed that most of the Calb-IR neurons in the esophagus are nitrenergic, and it suggested that the Calb-IR neurons might be primarily

involved in interneuronal roles in the esophageal nervous system.

3) **Yahara N., Sato K., and Nakano A.: An Arf1p GTPase-activating protein, Glo3p, executes its regulatory function through the Glo3 motif at its C-terminus.**

**Journal of Cell Science 119: 2604-2612, 2006.**

**Abstract:** ADP-ribosylation factors (Arfs), key regulators of intracellular membrane traffic, are known to exert multiple roles in vesicular transport. We previously isolated eight temperature-sensitive (ts) mutants of the yeast ARF1 gene, which showed allele-specific defects in protein transport, and classified them into three groups of intragenic complementation. In this study, we show that the overexpression of Glo3p, one of the GTPase-activating proteins of Arf1p (ArfGAP), suppresses the ts growth of a particular group of the arf1 mutants (arf1-16 and arf1-17). Other ArfGAPs do not show such a suppression activity. All these ArfGAPs show sequence similarity in the ArfGAP catalytic domain, but are divergent in the rest of molecules. By domain swapping analysis of Glo3p and another ArfGAP, Gcs1p, we have shown that the non-catalytic C-terminal region of Glo3p is required for the suppression of the growth defect in the arf1 ts mutants. Interestingly, Glo3p and its homologues from other eukaryotes harbor a well-conserved repeated ISSxxxFG sequence near the C-terminus, which is not found in Gcs1p and its homologues. We name this region the Glo3 motif and present evidence that the motif is required for the function of Glo3p in vivo.

4) **Kageyama-Yahara N., and Riezman H.: Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast.**

**Biochemical Journal 398: 585-593, 2006.**

**Abstract:** Ceramide plays a crucial role as a basic building block of sphingolipids, but also as a signalling molecule mediating cell-fate decisions. Three genes, LAG1, LAC1 and LIP1, have been shown to be required for ceramide synthase activity in *Saccharomyces cerevisiae* [Guillas, Kirchman, Chuard, Pfefferli, Jiang, Jazwinski and Conzelman (2001) EMBO J. 20, 2655-2665; Schorling, Vallee, Barz, Reizman and Oesterhelt (2001) Mol. Biol. Cell 12, 3417-3427; Vallee and Riezman (2005) EMBO J. 24, 730-741]. In the present study, the topology of the Lag1p and Lac1p subunits was investigated. The N- and C-termini of the proteins are in the cytoplasm and eight putative membrane-spanning domains were identified in Lag1p and Lac1p by insertion of glycosylation and factor Xa cleavage sites at various positions. The conserved Lag motif, potentially containing the active site, is most likely embedded in the membrane. We also present evidence that histidine and aspartic acid residues in the Lag motif are essential for the function of Lag1p in vivo.

◇ 総 説

- 1) 影山一矢原夏子, 山本 武, 門脇 真: 食物アレルギーの動物モデル.  
アレルギー・免疫 13: 1378-1384, 2006.

◇ 学会報告 (\*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) 兒玉利尚, 山本 武, 宇都宮奈穂, 蔵本博史, 門脇 真: 食物アレルギーの発症機序におけるマスト細胞及び PI3 キナーゼの役割. 日本薬学会第 126 年会, 2006, 3.28-30, 仙台.
- 2) 宇都宮奈穂, 山本武, 兒玉利尚, 門脇 真: マウス食物アレルギー病態モデルにおけるコリン性抗炎症免疫機構の病態生理学的役割.  
日本薬学会第 126 年会, 2006, 3.28-30, 仙台.
- 3) 山本 武, 兒玉利尚, 宇都宮奈穂, 門脇 真: オキサゾロン誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルの病態解析と治療薬探索.  
日本薬学会第 126 年会, 2006, 3.28-30, 仙台.

- 4) Utsunomiya N., Yamamoto T., Kodama T., Kuramoto H., and Kadowaki M.: PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF THE CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNE PATHWAY IN A MURINE MODEL OF FOOD ALLERGY. Digestive Disease Week, 2006, 5.20-25, Los Angeles, U.S.A.
- 5) Kodama T., Yamamoto T., Utsunomiya N., Kuramoto H., and Kadowaki M.: PATHOLOGICAL ROLE OF MUCOSAL MAST CELLS IN A MOUSE MODEL OF FOOD ALLERGY: NEW INSIGHTS FROM PHOSPHATIDYLINOSITOL-3 KINASE DEFICIENT MICE. Digestive Disease Week, 2006, 5.20-25, Los Angeles, U.S.A.
- 6) Yamamoto T., Kodama T., Utsunomiya N., Kuramoto H., and Kadowaki M.: PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF THE CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNE PATHWAY IN MOUSE OXAZOLONE-INDUCED ULCERATIVE COLITIS MODEL. Digestive Disease Week, 2006, 5.20-25, Los Angeles, U.S.A.
- 7) 藏本博史, 吉村亮一, 山本 武, 門脇 真: 食道における TRPV1 陽性神経線維の分布と起源. 第 29 回日本神経科学大会, 2006, 7.19-21, 京都.
- 8) Kuramoto H., and Kadowaki M.: VAGAL EFFERENTS PREFERENTIALLY INNERVATE NITRERGIC NEURONS OF RAT ESOPHAGUS : WITH REFERENCE TO FOS EXPRESSION. The 4th Congress of Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Society, 2006, 11.30-12.1, Hong Kong, China.
- \* 9) 山本 武, 門脇 真: 消化器症状を発現する食物アレルギーモデルマウスの病態解析と漢方薬による治療. 第 23 回和漢医薬学会大会 シンポジウム: アレルギーと和漢薬, 2006, 8.26-27, 岐阜.
- \* 10) Tohda C., Nakanishi R., Yokozawa T., and Kadowaki M.: ADHD-like behavior, synaptic loss and hypoplasia of myelinated axons by PI3 kinase deficiency. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学会大会合同年会, 2006, 9.14-16, 名古屋.
- 11) 中西類子, 東田千尋, 横澤隆子, 山本 武, 門脇 真: PI3K ノックアウトマウスの ADHD 動物モデルとしての検討. 日本薬学会北陸支部 第 115 回例会, 2006, 11.12, 富山.

#### ◇その他

- 1) Makoto Kadowaki: Pathological Role of Mucosal Mast cells in a Mouse Model of Food Allergy : new insights from phosphatidylinositol-3 kinase deficient mice. Seminar at Prince of Songkla University, 2006, 1.12, Songkla, Thai Land.
- 2) 門脇 真: 腸管機能の制御システムについて. 東京大学先端科学技術研究センター システム生物学ラボラトリーセミナー, 2006, 6.9, 東京.
- 3) 門脇 真, 門脇 孝, 藏本博史: 腸管粘膜免疫系及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・免疫機構及び PPAR $\gamma$  を介する抗炎症・免疫機構の破綻—. 財団法人 喫煙科学研究財団 第 21 回助成研究発表会, 2006, 7.13, 東京.
- 4) 門脇 真, 門脇 孝, 藏本博史: 腸管粘膜免疫系及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・免疫機構及び PPAR $\gamma$  を介する抗炎症・免疫機構の破綻—. 平成 17 年度財団法人 喫煙科学研究財団 研究年報: 473-478, 2006.
- 5) 山本 武: アレルギー性炎症の漢方治療—病態モデルでの基礎研究— 食物アレルギー病態モデル. 第 11 回富山大学 和漢医薬学総合研究所 夏期セミナー, 2006, 8.29-31, 富山.
- 6) 影山夏子: 「ラボレポート—留学編— スイスでのポストドク生活—University of Geneva」 実験医学 24: 1818-1820, 2006.
- 7) 影山俊一郎, 影山夏子: 「学会見聞記 第 18 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム—医学生物学における新しいコンセプト—」 蛋白質 核酸 酵素 51: 1899-1902, 2006.

- 8) Makoto Kadowaki: Therapeutic Strategy for Enteric Immune Diseases. Seminar at Medical School of Peking University, 2006, 10.26, Beijing, China.
- 9) Fujiwara K., Yamamoto T., Yoshida M., Kodama T., Utsunomiya N., Shibahara N., Aburatani H., and Kadowaki M.: THERAPEUTIC EFFECT OF KAMPO MEDICINE, KAKKONTO IN A MURINE MODEL OF FOOD ALLERGY WITH GASTROINTESTINAL SYMPTOM. JSPS-NRCT core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences. The 7th Joint Seminar "Recent Advances in Natural Product Research and its Application", 2006, 12.2-3, Toyama.
- 10) Yoshida M., Yamamoto T., Fujiwara K., Kodama T., Utsunomiya N., Watanabe T., and Kadowaki M.: THERAPEUTIC EFFECT OF KAMPO MEDICINE, SAIREITO IN A MURINE MODEL OF THELPER CELL TYPE 2 COLITIS. JSPS-NRCT core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences. The 7th Joint Seminar "Recent Advances in Natural Product Research and its Application", 2006, 12.2-3, Toyama.
- 11) キャンパス TODAY 「おじゃましまーす研究・ゼミ室 富山大学和漢医薬学総合研究所 門脇研究室」. 北日本新聞, 2006, 10.23.
- 12) 富山大学が研究「葛根湯が食物アレルギーを抑制」.  
富山テレビ放送 BBT スーパーニュース, 2006, 8.17.

#### ◇共同研究

##### 国内

- 1) 藏本博史：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門細胞機能学分野  
「腸管神経系、特に食道神経系における迷走神経（副交感神経）支配に関する研究」  
「食道神経系の形態学的研究」  
「結腸セロトニン含有腸クロム親和性細胞の生理学的及び形態学的研究」  
「腸管粘膜型マスト細胞の病態生理学的及び形態学的研究」  
「逆流性食道炎の病態生理学的及び形態学的研究」  
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 $\gamma$ 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マスト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：PI3 キナーゼ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マスト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：PI3 キナーゼ欠損マウスを用いての検討」  
2004, 7-
- 4) 東田千尋：富山大学 和漢医薬学総合研究所  
「PI3 キナーゼの神経変性疾患への関与に関する研究」  
2005, 10-

#### ◇研究費取得状況

- 1) 平成 18 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  
研究課題：実験潰瘍性大腸炎モデルにおける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
- 2) 平成 18 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  
研究課題：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) 富山県 平成 18 年度受託研究 和漢薬・バイオテクノロジー研究 担当：門脇 真  
研究題目：消化管をターゲットにした新しい和漢薬製剤の開発
- 4) 平成 18 年度 財団法人喫煙科学研究財団 代表：門脇 真  
研究課題：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 $\gamma$  を介する抗炎症・免疫機構の破綻
- 5) 平成 18 年度 財団法人漢方医薬研究振興財団 代表：山本 武  
研究課題：腸管粘膜免疫機能の破綻により誘発される食物アレルギーに対する漢方薬の治療効果とその機序の解析
- 6) 平成 18 年度 富山大学学長裁量  
「若手研究者（37才以下）の萌芽的研究に必要な経費」 担当：山本 武  
研究題目：腸管粘膜免疫機能の破綻により誘発される食物アレルギーに対する漢方薬の治療効果とその機序の解析自然免疫系に及ぼす漢方薬の効果に関する研究
- 7) 平成 18 年度 和漢医薬学総合研究所所長裁量 分担：山本 武  
研究題目：自然免疫系に及ぼす漢方薬の効果に関する研究

#### ◇研究室在籍者

薬学部 3 年生：末廣陽子  
薬学部 4 年生：藤原加苗，吉田益奈子  
大学院前期 1 年：宇都宮奈穂，兒玉利尚