

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591086  
 研究課題名（和文） 遺伝子破壊マウスを用いた ACTH 受容体 (MC2R) シグナルの機能的解析  
 研究課題名（英文） Functional analysis of ACTH receptor (MC2R) signal using MC2R knockout mouse  
 研究代表者  
 清水 力 (SHIMIZU CHIKARA)  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号：00292029

研究成果の概要（和文）：C57BL/6系を用いて交配を続けた MC2R 遺伝子破壊(KO)ホモマウスは出生後まもなく多くは低血糖にて死亡するため、B6/Balbc の混合遺伝背景をもつ MC2R KO マウスを用いて、野生型および MC2R-/-雄マウスを活動記録ケージで飼育し、自由行動下における活動を赤外線センサーを用いて、明暗サイクルならびに恒常暗期における行動リズムを評価した。現在のところ明暗リズムへの反応については野生型のマウスと MC2R-/-マウスで差を認めていない。引き続き、恒常暗期における活動周期のフリーランを評価し、さらに光刺激を加えリズム変位を解析する予定である。

研究成果の概要（英文）：It is well-known that hypothalamic-pituitary-adrenal axis has an apparent circadian rhythm. We evaluated the circadian behavioral variation on MC2R deficient mice. There was no difference on behavioral rhythms under light-dark cycle between wild-type mice and MC2R knockout mice. Behavioral pattern under constant darkness is now under investigation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ACTH 受容体、遺伝子破壊マウス、シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性は多岐にわたる内分泌環境の緻密な調節により維持されている。なかでも、間脳-下垂体-副腎系は、血圧・血糖の維持、電解質バランスの保持および各種ストレスに対する緩衝作用の点で従来から生命の維持に不可欠の内分泌制御系として知られていた。すなわち、視床下部ホルモ

ンである CRH (corticotropin releasing hormone; 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン) により下垂体では POMC

(proopiomelanocortin) の合成が促進され、下垂体細胞に内在する蛋白切断酵素の作用により、ACTH (adrenocorticotropin; 副腎皮質刺激ホルモン) を含む生理活性を有する複数のホルモンが産生・分泌される。ACTH

は副腎に作用し、副腎皮質ホルモンの産生・分泌を促進する。また上記のホルモンはネガティブフィードバックシステムにより厳密かつ協調的に制御されており、このシステムの破綻は種々の疾患の発症を招来する。申請者は、ACTH が従来より知られている副腎皮質ホルモン産生・分泌作用以外に何らかの生理作用を有するという作業仮説のもと、ACTH を唯一のリガンドとする MC2R に着目し、同受容体の脂肪組織における発現調節に関して解析・報告した (Kubo et al., Endocri J 2004, Kijima et al., Endocri Reg 2004)。さらなる解析には MC2RKO マウスの作成が必須であるため、遺伝子破壊マウス作成に必要な MC2R 受容体のゲノム構造を明らかにしたのち (Shimizu et al., Gene 1997)、世界ではじめて MC2RKO マウスを作成し、報告した (Chida et al., PNAS 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、今回作製した MC2R 遺伝子欠損 (KO) マウスに関してより詳細に解析し、ACTH の MC2R を通じての新たな生理作用を解析することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 解剖学的・組織学的検討

MC2RKO マウスを解剖し、肉眼的および組織学的差異の有無について野生型マウスと比較した。特に副腎に関してはより詳細に検討すべく皮質特異的な CYP11A1 と髄質に発現する Tyrosine Hydrolase に対する特異抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。

### (2) 行動異常の有無の検討

副腎皮質ホルモンの分泌は概日リズムを示すことが知られており、視床下部の視交叉上核における中枢時計が室傍核からの CRH 分泌をコントロールし、ACTH を介して副腎皮質におけるステロイドホルモン生合成に関与するとされている。ACTH ならびに MC2R の中枢時計に与える影響ならびに副腎皮質におけるステロイドホルモン生合成の概日リズムに対する影響についての検討はなされていない。そこで今回我々は ACTH ならびに MC2R の概日リズムへの関与を検討する目的で、MC2R ノックアウトマウスの概日リズムを検討することとした。方法として、野生型雄マウス 7 匹と MC2R<sup>-/-</sup>マウスをそれぞれ 7 匹ずつ個別の活動記録ケージで飼

育し、自由行動下における活動を赤外線センサーにて検出される活動記録装置を用いて明暗サイクルならびに恒常暗期における行動リズムを評価している。

## 4. 研究成果

研究開始当初、C57BL/6 系を用いて交配を続けていたが、MC2R<sup>-/-</sup>マウスの仔は出生するも生後まもなく死亡することにより実験解析することができなかった。そのため 129 系統でバッククロスを開始し、継代 4 世代の雌雄ヘテロ同士を交配させたところ、MC2R<sup>-/-</sup>マウスは出生するものの離乳時期を超える個体は得られなかった (MC2R<sup>-/-</sup>マウスの生存出生数も少なく生後数日で死亡)。そのため、129 系統でのバッククロスによる MC2R<sup>-/-</sup>マウス取得は断念し、MC2R<sup>-/-</sup>マウスの約半数が離乳時期まで生存可能な B6/Balbc の混合遺伝背景をもつ MC2R<sup>+/-</sup>マウスを入手し、交配、研究実施可能な個体数が得られるに至った。

### (1) 解剖・組織学的検討

MC2R<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して副腎が肉眼上著明な萎縮を認めた。HE 染色での検討では MC2R<sup>-/-</sup>マウスの副腎は野生型マウスと比較して著明な萎縮を認め、野生型で見られる球状層、束状層、網状層の 3 層構造が認められなかった。副腎束状層に主に発現するステロイドホルモン合成酵素の一つである CYP11A1 に対する抗体を用いた免疫染色では MC2R<sup>-/-</sup>マウスの副腎では染色像を認めず、束状層の萎縮が考えられた。髄質については HE 染色と Tyrosine Hydrolase に対する抗体を用いた免疫染色では明らかな差を認めなかった。今後、組織学的検討として肝、下垂体、視床下部といった副腎以外の臓器の組織学的検討を行う予定である。

### (2) 行動異常の有無の検討

明暗リズムへの反応については野生型のマウスと MC2R<sup>-/-</sup>マウスで差を認めていない。今後恒常暗期における活動周期のフリーランを評価し、さらに光刺激を加えリズム変位を解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計22件)

1. Higashi T, Ichikawa T, Shimizu C, Nagai S, Inagaki S, Min JZ, Chiba H, Ikegawa S, Toyo'oka T. Stable isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of thyroxine in saliva. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879:1013-1017, 2011 (査読あり)
  2. Shinohara N, Takahashi M, Kamishima T, Ikushima H, Otsuka N, Ishizu A, Shimizu C, Kanayama H, Nonomura K. The incidence and mechanism of sunitinib-induced thyroid atrophy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 104:241-247, 2011 (査読あり)
  3. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 72:272-276, 2010 (査読あり)
  4. Shigemura M, Nasuhara Y, Konno S, Hattori T, Shimizu C, Matsuno K, Nishimura M. Levels of Transferrin in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Sarcoidosis. *Lung.* 188:151-157, 2010 (査読あり)
  5. Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J Lipid Res.* 51:975-982, 2010 (査読あり)
  6. Fukumoto T, Matsuo J, Hayashi M, Oguri S, Nakamura S, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Yamaguchi H. Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival in vitro without requirement for amoebae. *J Clin Microbiol.* 48:3360-5, 2010 (査読あり)
  7. Hattori T, Konno S, Takahashi A, Isada A, Shigemura M, Matsuno K, Shimizu C, Hizawa N, Yamaguchi E, Nishimura M. The role of atopy in the clinical course of pulmonary sarcoidosis in the Japanese population. *Allergy Asthma Proc.* 31:238-243, 2010 (査読あり)
  8. Sawada T, Miyoshi H, Shimada K, Suzuki A, Okamatsu-Ogura Y, Perfield JW 2nd, Kondo T, Nagai S, Shimizu C, Yoshioka N, Greenberg AS, Kimura K, Koike T. Perilipin overexpression in white adipose tissue induces a brown fat-like phenotype. *PLoS One.* 5:e14006, 2010 (査読あり)
  9. Matsuo J, Oguri S, Nakamura S, Hanawa T, Fukumoto T, Hayashi Y, Kawaguchi K, Mizutani Y, Yao T, Akizawa K, Suzuki H, Shimizu C, Matsuno K, Kamiya S, Hiroyuki Yamaguchi H. Ciliates rapidly enhance frequency of conjugation between *Escherichia coli* strains through bacterial accumulation in vesicles. *Research in microbiology.* 161:711-719, 2010 (査読あり)
  10. Kaga S, Mikami T, Onozuka H, Omotehara S, Abe A, Yamada S, Okada M, Komatsu H, Inoue M, Yokoyama S, Nishida M, Shimizu C, Matsuno K, Tsutsui H. Right ventricular diastolic dysfunction in patients with left ventricular hypertrophy: analysis of right ventricular myocardial relaxation using two-dimensional speckle tracking imaging. *J Echocardiogr.* 7:25-33, 2009 (査読あり)
  11. Komatsu H, Yamada S, Iwano H, Okada M, Onozuka H, Mikami T, Yokoyama S, Inoue M, Kaga S, Nishida M, Shimizu C, Matsuno K, Tsutsui H. Angiotensin II receptor Blocker, Valsartan, Increases Myocardial Blood Volume and Regresses Hypertrophy in Hypertensive Patients. *Circulation J.* 73:2098-2103, 2009 (査読あり)
  12. Ikegawa S, Hasegawa M, Okihara R, Shimizu C, Chiba H, Iida T, Mitamura K. Simultaneous Determination of Twelve Tetrahydrocorticosteroid Glucuronides in Human Urine by Liquid Chromatography/ Electro spray Ionization-Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 81:10124-10135, 2009 (査読あり)
  13. Okamoto T, Atsumi T, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T. The potential role of macrophage migration inhibitory factor on the migration of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 15:13-19, 2008 (査読あり)
- [学会発表] (計 8 件)
1. Chikara Shimizu et al., Mutation Analysis of SDHB and SDHD gene in

pheochromocytomas and paragangliomas: identification of a novel nonsense mutation (Q168X), 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), March 26-30 2010, Kyoto, Japan

2. 清水 力、甲状腺機能と血中アルブミン(a1b)濃度との関連性、第83回日本内分泌学会学術総会、2010年3月25日～28日、京都
3. 清水 力 他、著明な下腿浮腫および低アルブミン血症を伴った Graves 病の一例－甲状腺機能と血中アルブミン濃度との関連性、第56回日本臨床検査医学会学術集会、2009年8月26日～29日、札幌
4. Chikara Shimizu et al., Study of Administration Interval of Octreotide LAR in the Treatment of Acromegaly, 91th Annual Meeting of the Endocrine Society (ENDO2009), June 10-13 2009, Washington DC, USA
5. 清水 力 他、成人成長ホルモン分泌不全症患者におけるメタボリックシンドローム構成因子に関する検討、第55回日本臨床検査医学会学術集会、2008年11月27日～30日、名古屋
6. 清水 力 他、先端巨大症治療におけるオクトレオチド LAR 投与間隔延長の可能性について、第8回日本内分泌学会北海道地方会、2008年10月18日、札幌
7. 清水 力 他、先端巨大症治療におけるオクトレオチド LAR 投与間隔延長の試み、第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16日～18日、青森

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 力 (SHIMIZU CHIKARA)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：00292029

### (2) 研究分担者

三好 秀明 (MIYOSHI HIDEAKI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：30360902

### (3) 連携研究者

なし