

At our research center, we have encountered many twin pregnancies after double embryo transfer. However, except for 3 offspring raised by use of artificial nursing, both twins have never survived infancy. Maintaining multiple pregnancies is difficult in macaques, because they generally give birth to only one fetus.^{2,7} Methods for maintaining multiple pregnancies in and managing the birth process of cynomolgus monkeys need to be improved. The current case is an unusual example of double embryo transfer leading to triplet pregnancy in cynomolgus monkeys.

Acknowledgment

We thank T Nakagawa for managing animal care and assisting in the investigation.

References

1. Aston KI, Peterson CM, Carrell DT. 2008. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction* 136:377–386.
2. Bercovitch FB, Widdig A, Berard JD, Nurnberg P, Kessler MJ, Schmidtke J, Trefilov A, Krawczak M. 2002. Multiple sirehood in free-ranging twin rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol* 57:31–34.
3. Ferreira M, Bos-Mikich A, Höher M, Frantz N. 2010. Dichorionic twins and monozygotic triplets after the transfer of 2 blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 27:545–548.
4. Li Y, Yang D, Zhang Q. 2009. Dichorionic quadramniotic quadruple gestation with monozygotic triamniotic triplets after 2 embryos transfer and selective reduction to twin pregnancy: case report. *Fertil Steril* 92:2038.e13–2038.e15.
5. Mitalipov SM, Yeoman RR, Kuo HC, Wolf DP. 2002. Monozygotic twinning in rhesus monkeys by manipulation of in vitro-derived embryos. *Biol Reprod* 66:1449–1455.
6. Okahara-Narita J, Tsuchiya H, Takada T, Torii R. 2007. Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates* 48:232–240.
7. Sugiyama Y, Kurita H, Matsui T, Shimomura T. 2011. Twinning frequency of Japanese macaques (*Macaca fuscata*) at Takasakiyama. *Primates* 52:19–23.
8. Torii R, Fujinami N, Hosoi Y, Takenoshita Y, Iritani A. 2001. First successful birth of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) by intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer (ICSI-ET). *Exp Anim* 50:259.
9. Torii R, Hosoi Y, Masuda Y, Iritani A, Nigi H. 2000. Birth of Japanese monkey (*Macaca fuscata*) infants following in vitro fertilization and embryo transfer. *Primates* 41:39–47.
10. Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Okahara J, Sankai T, Torii R. 2011. Vitrification and transfer of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 76:33–38.

SPDP LETTERS

The Society of Primate Diseases and Pathology (SPDP)

July, 2012 • 2012年7月31日

(第3号)

<巻頭総説>

❖ 早期妊娠診断と胎児の雌雄判定技術の開発研究に携わって

山海 直 (サル類の疾病と病理のための研究会理事兼事務局)
独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

<連載>

❖ 実験用サル学事始め

(3) 麻疹ウイルス感染排除の努力と「実験用サル」シンポジウム開催

本庄 重男

元 国立予防衛生研究所 筑波医学実験用霊長類センター 所長
元 愛知大学 教授

❖ 動物愛護について (3)

宮嶋 宏彰 (サル類の疾病と病理のための研究会顧問)
株式会社ケー・エー・シー

<会員の集まる喫茶店>

❖ Monkey-tail Café

長谷川 有美 (理化学研究所)

板垣 伊織 (社団法人 予防衛生協会 / サル類の疾病と病理のための研究会)

編集/発行 サル類の疾病と病理のための研究会

(連絡先) 板垣伊織 spdp.itagaki@gmail.com

記事および画像・写真の無断複製、使用、転用を禁止します。必要な際はご一報下さい。

<巻頭総説>

早期妊娠診断と胎児の雌雄判定技術の開発研究に携わって

山海直 (サル類の疾病と病理のための研究会理事兼事務局)

独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

カニクイザルの妊娠診断は、主として超音波診断装置が用いられている。本装置の性能が年々良くなり、術者は極めて鮮明な画像で診断できるようになってきた。確実に妊娠の有無を判断するためには交配後5週以降という時代もあったが、今では4週あるいは3週でも診断が可能である。熟練した術者ならば3週以前でも診断できるかもしれない。排卵のタイミングで交尾が成立したとき、射精した精子は5~10時間程度で受精能を獲得し受精が成立すると考えられる。その後、胚は卵管内で発生を続け約1週間で子宮に到達し着床する。おおよそ100 μ mの胚が着床後、一気に成長しその2週間後には画像で観察できるということになる。何気なく行われている画像診断かもしれないが、その機器の性能のすばらしさ、また、1個の細胞である卵が3週間後には画像で認められるまで成長するという現実に感動する。画像以外の妊娠診断法としてホルモン測定がある。ヒトでは尿中に含まれるCGの有無を確認することで妊娠の判定が可能であり、市販の複数メーカーのキットでサルの妊娠診断に挑戦したことがある。すべて失敗。尿中あるいは血中のCG、とくに β サブユニットCGを測定することで妊娠診断ができるはずであるが、ヒト用キットはすべてモノクローナル抗体が用いられており、サルのそれとは反応しないということである。その後、偶然見つけたキットがカニクイザルの β CGとクロスする抗体を使っていることがわかり、妊娠3週目で確実な診断が可能となった。しかし、昨年、その抗体を使った測定系のキットの市販が終わってしまい、今はカニクイザルの β CGは測定できない。低コストかつ高感度のヒト用ホルモン測定を実現するための技術導入で、皮肉なことにサルのホルモン測定ができなくなったということである。

妊娠診断に限らず、ヒト用に開発された試薬や機器をサル類での研究に使用することが多々あるが、一方で、試薬等の純化度の向上、性能の高度化はヒトへの特化の度合いをあげてい

る現実がある。サル類に関わる研究者は、今まで以上に知恵を振り絞って対処しなければならない。

早期妊娠診断は、胎児の実験使用や効率よく繁殖するために確立しておきたい技術であるが、同時に胎児の雌雄判定はできないものか。胎児のDNAが母体の血中から検出できるという報告があり、さっそくカニクイザルで試してみた。本件に関する情報、とくにサル類での情報は少なく、当初は疑って実験をスタートした。胎盤の機能を考えると、胎児由来のものが母体に移動することは考えにくく、それが事実だとしても母体の免疫系によりすぐに処理されることになる。また、なぜそのような現象が起きるのか、生物学的意義がわからない。しかし、これが事実だとすればDNA疾患を妊娠初期に検出することができ、胎児期での治療法の開発につながる可能性がでてくる。母体は必ずメスである。よってまずは胎児がオスの場合、Y染色体上の遺伝子が母体血中から検出できるかどうかを確認した。その成功により、結果的に雌雄判定が可能となった。目的遺伝子が検出されたときはオス、検出されなかったときはメスということになる。胎児が大きく成長するにつれて母体血中を循環する胎児由来DNA量も多くなるが、妊娠初期であってもそのDNAは母体に入り込んでいることが確認された。検出感度を上げることで、妊娠5週目であっても胎児由来DNAが検出可能となった。しかも雌雄判定の的中率100%、誤った判定は一例もなかった。この現実を見て、あらためて様々なことを考えさせられた。どのような機序で母体血中に移動するのか、なぜ、何のために、とわからないことばかり。先日 Natureに「Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome」という論文が発表された。この現象は今後、多くの研究者によって解明されていくことだろう。

教科書や参考書に書かれていることがすべて真実だと思い込んでいる者は少なくない。しかし、人類は不可能を可能にし、今までわからなかったことを解明する動物。教えられてきたことを頑固な頭で記憶していたのでは、クローン動物やiPS細胞などもこの世に出現しなかっただろう。前回の SPDP Letters で紹介されたプリオンも私が学生のときの教科書にはウイルスと記載されている。教科書や参考書は最新の研究成果を踏まえて常に修正、改定されていくものと思っていた方がよい。一方、持つことも見ることもできないヒッグス粒子と思われる新粒子が確認されたという。物質に質量を与えるものであり、宇宙の誕生にどうしても必要なものだったらしい。理論的に提唱されていたものを半世紀かけて研究者はそれを確認したという。信じ続けることと疑うこと、そのときどきで判断できる柔軟な頭が必要なようである。

<連載I>

実験用サル学事始め

本庄 重男

元 国立予防衛生研究所 筑波医学実験用霊長類センター 所長

元 愛知大学 教授

(前号から続く)

(3) 麻疹ウイルス感染排除の努力と「実験用サル」シンポジウム開催

わが国でも、ポリオワクチンに次いで麻疹ワクチンが開発され、1965年4月予研には麻疹ウイルス部 (宍戸 亮 部長) が新設されました。私たちは同部が担当する麻疹ウイルスの研究やワクチン検定に使用されるサルの世話を受け持ちました。

ところが困ったことに、野生由来の輸入カニクイザルでは、本来ヒトのウイルスである麻疹ウイルスの自然感染がしばしば認められました。抗体陽性率は入荷群ごとに大きな違いがありました。全体的には10%程度でした。言うまでもなく、麻疹ウイルス抗体陽性のサルを麻疹ウイルスやワクチンの実験に使うことはできません。ですから、私たちは抗体陰性のサルの確保に大変苦勞しました。当時、原産国から輸入されるサルは数頭から10数頭ごとひとまとめに一つのケージに積み込まれて輸送されて来ました。これでは個体間の接触が甚だしく、1頭でも麻疹ウイルスを排出しているサルがいれば、輸送中にウイルスは同じケージ内の他のサルに容易に伝播すると考えられました。それで、せめて隔壁で仕切った区画に1頭ずつ収容して輸送する方式に改めるよう、輸出業者に働きかけたりもしました。何故そうすることが必要かを相手方に十分理解して貰うには、先ず仲介の日本側の商社に理解して貰わねばなりません。この点で、私は現地の事情に通じている日本側の商社、リサーチ・プライメーツ・ジャパンの川西康夫 博士 (獣医師) の多大な協力を得ることができたことを忘れるわけには行きません。また、私たちが総出動で行なう通例100頭前後の新入荷サルの検収作業も一層注意深く行なうよう (一頭ごとに、検査者のゴム手袋を消毒したり注射針・注射筒を交換するなど) 十分に心がけたものです。ともあれ、事態は少しずつ改善され、何とか検定に必要な数のサルを確保できるようになりました。この辺りの仕事では、当時麻疹ウイルス部の担当室長だった、

山内一也 博士 (現 東京大学名誉教授) と色々詳しく話し合っただけを進めたことを懐かしく思い出します。

その後の話ですが、輸入の野生カニクイザルが輸入過程のどの辺りで麻疹ウイルスに感染するのかを明らかにしたいと考え、マニラで開かれたWHOの人畜共通感染症セミナーに出席したついでに、原産地 (フィリピン、マレーシア、インドネシア) へ調査に行きました。生息地で捕獲直後や輸出業者のコンパウンドに収容されている時期や飛行場に搬出される直前などに、サルを保定して採血・採便し予研の私たちの研究室に送りました。熱帯の太陽が照りつける大地でのサルからの採材作業は難儀でしたが、同行して下さった上記の川西博士の支援を得て無事終了しました。この調査の結果、野生の生息環境では麻疹ウイルスの感染は認められず、輸出業者の収容施設で人間と接触するようになって人間側から麻疹ウイルスが伝播され、輸送途中にも拡がり、結果として予研入荷後にも抗体陽性率が高まるということが確認されました。同時に行なった赤痢菌の保菌調査でも、野生の生息環境では保菌サルは認められず、捕獲後の過程で人間側から赤痢菌を伝播されることが明確になりました。つまり麻疹ウイルスや赤痢菌の感染に関して、サルは人間からの被害者であると言えます (Bウイルスや類鼻疽菌に関しては、逆にサルが人間に対し加害者の役割を演じています)。

私たちは、カニクイザルで得られた貴重な生物医学的データや野生サルを実験動物化する道筋についての考え方を多くの研究者に理解して貰うことを目的として、当時恒例であった予研シンポジウムの獣疫部担当課題に「実験動物としてのサル」を取り上げることにしました。私は今泉部長と相談して以下のような構成を決め、関係各位からの諒承を得ました。

緒言: シンポジウムの意義	今泉 清 (獣疫部)
1. 実験に使われているサルの種類	小寺重孝 (日本モンキーセンター)
2. カニクイザルにみられる自然感染	
(1) 蠕虫寄生	橋本いさお (寄生虫部)、本庄重男 (獣疫部)
(2) 細菌感染	小河秀正 (病理部)、高阪精夫 (獣疫部)
(3) サル腎組織培養のシミアンウイルス汚染	下條寛人 (腸内ウイルス部)
(4) 麻疹ウイルス感染	矢戸 亮 (麻疹ウイルス部)
3. サル病理像とヒト病理像の類似性	江頭靖之 (病理部)
4. 人工飼育環境への生理的適応	本庄重男 (獣疫部)
5. 人工繁殖の試み	藤原 徹 (獣疫部)、今道友則 (日獣大)
6. ウイルス発癌研究でのカニクイサル新生仔の有用性	山内一也 (麻疹ウイルス部)

このシンポジウムは1966年5月に予研の大会議室で開催されました。当時予研の研究者の間ではサルへの関心が相当に高かったせい、会場一杯の聴衆が最後まで熱心に聴いて下さり、私はとても感激しました。この種の課題のシンポジウムは、わが国で初のことであり、その後、実験動物学会などでも取り上げられるようになりました（この頃は未だ日本霊長類学会は組織されていませんでした）。また、国際的にも稀な例であったためか、JJMSB, Vol.19, No.4, Aug. 1966 に掲載された抄録集には諸外国からの別刷請求の葉書が度繁く舞い込みました。

今回は、部間のセクショナリズムを乗り越えての共同作業で総合的な成果を挙げ得たことを、カニクイザルからの麻疹ウイルス排除問題を例に述べました。多くの関係各位に心から感謝致します。次回は、繁殖・育成により実験動物化の達成へ向けて歩み出したことを顧みたいと思います。

(SPDP LETTERS 第4号・2012年10月に続く)

【お知らせ】 アジア野生動物医学会2012



10-12
October 2012
Bangkok, Thailand
"One World One Health in Asia"



アジアにおける野生動物保護・保全の祭典、
今年タイで開催です。
雨期明け(予定)のバンコック、チェンマイで
"One World One Health",
動物たちと人間社会の関係について
もう一度考えてみませんか。

and **Satellite Symposium**
in **Chiang Mai**



13-14

October 2012

Asian Society for Zoo and Wildlife Medicine (ASZWM) 2012

会期: 2012年10月10～14日

会場: International Trade and Exhibition Centre, Bangkok (10～12日, 本大会)
Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai (13～14日, サテライトシンポジウム)

☆詳しくはSPDPの Websiteで <<http://www.spdp.jp/2012/06/aszwm-2012-01/>>

<連載2>

動物愛護について (3)

宮嶋 宏彰

株式会社ケー・エー・シー

3. 実験動物倫理 (前号から続く)

3.4 動物の倫理とヒトの医療

動物の倫理とヒトの医療との関係は、前述したように究極的には2者択一の問題にいきつく。なぜならば、動物実験はヒトの医療のための、いわば必要悪であり、結局のところ、動物の生命を優先するか、ヒトの生命を優先するかの問題に行き着くからである。動物愛護論者は自然界の摂理を見直し、動物は宇宙を構成する重要な要素の一つであるから、目的がたとえ、人命救助であっても、その手段として原則的に動物を殺してはならないと考えるのである。将来、実験動物を用いずに、動物代替法その他によって、動物を丸ごと用いる *in vivo* の実験と同程度か、あるいはそれ以上の情報が得られる時代が来るかもしれない。

しかし、そのような時代が来るまで、今まさに、病気に苦しみ、生命を脅かされ、死に直面している人々を見殺しにすることができるだろうか。もし、できないならば、動物愛護論者は対案として動物実験をせずに、動物実験と同等かあるいはそれ以上の情報が得られる手段を、具体的に提示しなければならない。対案の提示ができないのであれば、ヒトの生命が動物の生命に優先することを容認しなければならない。動物愛護至上主義だけでは動物実験に関わる人々はもとより、社会一般の多くの人々の同意を得ることはできないであろう。

一方、科学万能主義者によれば、ヒトは科学の力によって、自然の改造が可能であり、ヒトの福祉が目的であれば、動物は自然界の一部であるから、手段としての動物実験は許容されると考える。ヒトの寿命も、最新医療を用いて、万難を排して生きながらえる努力をするべきであると考え。最近はこれらについても「幸福とは何か」「QOLとは何か」。という立場から反省の機運がある。

3.5 動物愛護の問題点

動物愛護を考えると、しばしば欧米の有識者の説を引用して、事足りりとする傾向があり、正面きって自己の説を主張する人はすくない。今こそ声を大にして己の考えを主張したらどうだろう。

3Rsは前述のように科学と倫理のはざまに生まれた過渡的方策で、絶対的倫理ではない、従って絶対的な解決策にはならない。例えば、苦痛の軽減 (refinement of method) で安楽死を推奨しているが、ヒトに置き換えてみれば、その矛盾は明白である。

動物愛護論者は、動物実験は究極的に動物虐待であると考えているので、動物実験論者との接点はない。動物愛護論者と動物実験論者が対立している現状では、相互に可能な限り妥協点を見出す努力をし、当面、現状を容認するしかない。その場合、お互いの主張と共に、自己の矛盾点を明確に認識すべきである。

動物の立場でヒトの生命を見殺しにするか、ヒトの立場で動物の生命を奪うかを迫られたとき、どちらが正しくて、どちらが誤りであるというのではなく、基本的には選択の問題である。換言すれば、どちらが善でどちらが悪だという問題ではない。科学には善とか悪という概念はない。例えば、酸素は善で窒素は悪であるということはないであろう。

動物愛護の問題の不幸は善と悪とに区別することから始まった。科学は善悪を度外視した環境で始めて成立する。従って動物愛護の問題は科学ではない。むしろ哲学の問題である。従って、現状では動物愛護の問題は、立場の違うお互いが、それぞれ選択した路線をそのまま貫くしかない。

動物愛護そのものに反対するヒトはいない、同じくヒトの生命の尊さとその維持を尊重することに反対するヒトはいない。しかし、その目的を達成するための手段が相互に対立し、それを乗り越える (止揚する; Aufheben) 哲学の出現がないのが現状である。

以上の観点に立って、問題点を整理すると当面の解決には以下の3種類の努力があると考えられる。

- 1) 動物を使用しなくとも、生命現象の普遍的原理を *in vitro* で推定可能にすることである。代替法研究の進歩により部分的には可能になってきているが、いずれにしても、*in*

vitro では *in vivo* と同程度かそれ以上の情報が得られ、解析的、効率的、経済的であることを追求することである。

- 2) 動物愛護とヒトの福祉との対立点を解消する高次の哲学を創出することである。高次元の哲学が誕生した時、相互の矛盾が自ずから解消されるであろう。
- 3) 上記のいずれかが実現した時代が来るまでは、動物愛護を選択するか、ヒトの福祉を選択するかについて己の選択した立場を貫くしかない、その際、相互に己の抱えている矛盾点を認識し、1)、2) へ向かって前進する努力を怠ってはならない。

この問題に限らず、ヒトを含めて生物の生命とは何か、生物相互の生命に対立関係が生じた時、それをどう解決するか、生命の根源に関わる基本的な疑問の解決が迫られているのであろう。

3.6 遺伝子組み換えや再生医療と実験動物

近年、特定の遺伝子を組み換えて、疾患モデル動物を作製する機運が急速に進んでいる。原理的にはヒトの病的遺伝子に対応する実験動物の遺伝子異常は、ヒトと相同の疾患形質を表現する可能性があるということである。

また、最近の、ES細胞 (embryonic stem cells、胚性幹細胞) や iPS細胞 (induced pluripotent stem cell、誘導多能性幹細胞) の出現は、これまで治療法のなかった疾患の前途に明るい希望をもたらした。たとえば、ES細胞から網膜細胞を作製して、ほとんど全盲の患者の視力を改善したり、カニクイザルの脳にヒトの皮膚由来のiPS細胞を移植して、ドーパミンを産生させ、パーキンソン病の治療に役立てる研究も進んでいる。とくにサル類を用いた研究は、他種の実験動物ではできない高次脳機能学の分野で大きく貢献することが期待される。

まさに、近い将来、人間が全ての生物を、神にかわって、作り替えてしまう勢いを感じさせる。今後このような技術が一般的になるに従って、安全性とともに倫理面についても多くの議論が呼び起こされるであろう。また、動物とヒトとは同一価値観の上の生命体として考えるようになり、両者の境界が極めて不鮮明になっているのである。われわれは今、ヒトの生命とは何か、動物の生命とは何かを問い直す時代に身を置いており、更に、生命の根源にかかわる基本的な疑問が問い直されているのである。

(SPDP LETTERS 第4号・2012年10月に続く)



会員が集まってご自分のお仕事について語り合う喫茶店「Monkey-tail Café」のコーナーです。交流の場としてご愛顧下さい。今号は理研でご活躍中の会員、長谷川さんからご寄稿いただきました。また「隗より始めよ」ということで私も自己紹介させていただきます。

ハプニングの連続に格闘する日々



理化学研究所 脳科学総合研究センター

適応知性研究チーム

長谷川 有美 (SPDP No. 1280)

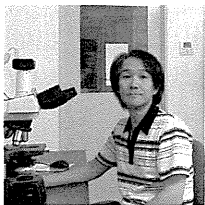
私は、実験動物としてマカク属のサルと向き合うようになってから早いもので約20年になります。獣医師として精神面や栄養面も含めた日常の健康管理、実験に必要な装置装着にともなう手術とその前後の管理など様々なことを行い、その都度発生する数々の難問に対し試行錯誤を繰り返しながら格闘してきました。

例えば、所属研究チームが行っている神経科学の研究では神経細胞活動の記録を行うために記録用電極の埋め込み手術を行い、サルの頭蓋骨には電気活動を記録するためのコネクタを装着します。サルからしてみれば、麻酔からさめたら自分の頭に突然異物が出現、しかも周囲がなんだかチクチク痛痒いとくれば、しょっちゅう気になるのも仕方ありません。せつかく出来た痂皮を剥がしたり、縫合糸をつまんだり引っ張ったり、しまいには縫合創を引っ掻き広げてしまうのまでいて、何もそこまでしなくても・・・と毎回がっかりしていました。そこで手術創の治癒促進を目的とし、術後2週間ばかりの間なんとかサルに傷口を触らせないようにするために、ギブスの材料や歯科医が使う様々な材料などを駆使して手術創を覆う、丁度ユダヤ教徒がかぶるようなカスタマイズした帽子を作ったり、フルフェイスのヘルメットを作ったりと工夫を重ねてきました。今から思えばそんな帽子のようなものをかぶるサルを見て、施設の飼育担当者は何事かと驚いていたことでしょう。結局さらなる試行錯誤の末、現在はシリコン樹脂や歯科用セメントを利用してより軽量でコンパクトなモノにたどり

着き、これによってサルが治癒の過程で傷をいじらないので治りも早くなり、術後の皮膚退行も見られなくなって非常にいい状態を保てるようになっていきます。

その他にも自傷癖のあるサルで傷の縫合ばかり続いたり、具合も悪くないのにケージの中で大の字になって仰向けになる癖のあるサルに心配させられたりなどなど、悩ましいことは続いています。また、こちらは治療を目的として行っているのに到底そのようには理解してもらえず、彼らが時々見せる怒りの感情表現にめげそうになることも。しかし、彼らの豊かな個性や時折見せるユニークな発想の行動、人間と変わらない仕草を見ると、もっと彼らを理解してあげたいと強く思い、これからも動物の福祉にのっとり、彼らが実験動物としての役割を十分果たせるよう感謝の気持ちを忘れずに業務に取り組みたいと思っています。

Monkey-tail Café 雇われ店長の本業について



社団法人 予報衛生協会

サル類の疾病と病理のための研究会理事

板垣 伊織 (SPDP No. 1147)

他人にもものを頼む前に自ら実践せよと、とは誰の言葉か存じませんが、確かにその通りだと思います。この "Monkey-tail Café" の企画をスタートさせて以来、何人かの会員にご寄稿をお願いしましたが、丁寧にお断りされるケースの方が多い訳です。やはりまずは自分でやらないとお願いに説得力がないということでしょう。すでに連載2回目で遅きに失した感もありますが、前述したお言葉を実践させていただきます。

一方で、わからないことは知っている人に聞きましょう、というのはわたくしの信条のひとつです。サル類を扱う仕事や実験をしていると、わからないことがたくさん出てきませんか。例えば、医薬品候補化合物の薬効を調べるためにカニクイザルで経口糖負荷試験 (OGTT) をやったことがあります。糖負荷後30分くらいで血糖値がぐっと上昇し、その後だんだん低下して平時に復する。病態対照ではその減衰カーブが緩やか。そんなデータを期待したのですが、実際に描かれたグラフは理解に苦しむものでした。ピークは糖負荷「前」値で、そこからただ下るだけ。科学的に説明ができない。インスリン値は、と見ると、バラツキが大きくて何ら参考になりません。薬理試験のベテラン諸氏にお伺いすると、カニクイザルではそんなものだよ。OGTTはあきらめて静脈内糖負荷試験 (ivGTT) をやりなさい。なのだそうです。そ

の後どうなったかは割愛します。結果だけ。第16回サル疾病ワークショップで発表しました。
https://spdp.sakura.ne.jp/members/ws/WorkshopArchives/16th/entries/2007/12/7_WS16-015.html。

また、このところ開店休業中ですが、昨年度まではマカクザルのMR画像をよく撮っていました。主に脳が対象です。これまで長く非臨床・前臨床の業界にいていろんな動物実験をこなしてきましたが、MRIを扱うのは初めてでした。いざサルの脳を撮ってみると、医療現場で見るヒトの脳の画像とは大分違う。もちろん脳の大きさや脳溝の数ではなく、画質があまり鮮明ではないのです。撮像条件を調整しようにも、Echo time? Repetition time? Flip angle? な状態でしたので、如何ともなりません。そこで頼ったのが、MRIメーカーの日本代理店、シーメンスジャパン不動のエース、瀧澤 修さんという方でした。細かいこと、解らないことをいちいち質問し、時には直接コンソールの前でご指導いただき、おかげ様で実験的脳梗塞巣体積の画期的な定量法 (2010年のアジア野生動物医学会で発表) や、腹部体脂肪の3D形態計測法
https://spdp.sakura.ne.jp/members/ws/WorkshopArchives/20th/entries/2011/7/2_%5BP%5D-10.html を樹立するに至りました。しかし、さすがの瀧澤師匠もMRIで骨密度を測りたい(*)...という無謀な質問にはあきれ果てた様で、その後は音信が途絶えています。

* 不可能ではありませんが、研究段階です。電磁コイルの根本的な改造が必要な様です。

さて、SPDPの連絡でおなじみのわたくしですが、サルに関するプロフィールを紹介したくてここまで書いて参りました。紙面は尽きましたが、とても書き切れていません。大人の事情で書けないこともあります。会員の皆さんが得意とする所は何か、それを集めるのが "Monkey-tail Café" の目的で、それが集まればりっぱな人材データベースができ上がります。SPDPの財産は会員の皆さんです。でも点ではいけません。ネットワークでつながれば、線になり面になり、3D, 4Dと次元は広がって、遙かなパワーを生み出すと信じています。わからないことを知っている人が分る、というのも、SPDPの強みのひとつになるとは思いませんか。という訳で、次号から改めて "Monkey-tail Café" へのご寄稿、どうぞよろしくお願ひします。

第21回サル疾病ワークショップを開催しました

開催日 2012年7月14日(土)

場所 麻布大学8号館7階 百周年記念ホール
 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71

テーマ 霊長類を用いた医科学研究のための全国共同利用施設～連携と分担～

今年もたくさんのご参加を頂きました。展示ポスターを囲んでのランチョンセミナーも盛況で、楽しい時間を過ごすことができました。

詳しい報告は、SPDPのサイト <<http://www.spdp.jp/2012/07/21-1/>> をご覧下さい。

表紙のサル (アカゲザル 成獣 ♂)



カトマンズの西を守護する寺院 スワヤンブナート、通称 "Monkey Temple"。周辺の杜で暮らす野生のアカゲザルの群れにとって、遊び場と餌場・水場のある重要な生活区である。表紙のサルは群れに先行して現れ、境内を鋭い眼で見渡す。子ザルや雌ザルの安全を確保する役割を担っている、群れの若者であろう。額の白点は、社殿の化粧直しに使っているペンキが付いたものか。間もなネパール最大の祭り、ダサインが始まる。2011年10月26日 板垣写す

SPDP LETTERS (季刊)

第3号 2012年7月31日発行

発行者 サル類の疾病と病理のための研究会

編集委員 宮嶋 宏彰、板垣 伊織

[連絡先] spdp.itagaki@gmail.com (板垣 伊織)

SPDP LETTERS では、サル類に関する 記事、ニュース、総説、論説など、会員の皆様からの投稿をお待ちしております。お問い合わせは編集委員連絡先まで。

サル類の疾病と病理のための研究会

賛助会員

第一三共株式会社 安全性研究所

ハムリー株式会社

オリエンタル酵母工業株式会社

参天製薬株式会社

株式会社 ボゾリサーチセンター

株式会社 新日本科学

株式会社 イナリサーチ

大鵬薬品工業株式会社 徳島研究センター 安全性研究所

Involvement of SIK3 in Glucose and Lipid Homeostasis in Mice

Tatsuya Uebi¹, Yumi Itoh¹, Osamu Hatano², Ayako Kumagai^{1,3}, Masato Sanosaka¹, Tsutomu Sasaki⁴, Satoru Sasagawa⁵, Junko Doi⁶, Keita Tatsumi⁷, Kuniko Mitamura⁸, Eiichi Morii⁹, Katsuyuki Aozasa⁹, Tomohiro Kawamura¹⁰, Meinoshin Okumura¹⁰, Jun Nakae¹¹, Hajime Takikawa¹², Toshio Fukusato¹³, Minako Koura¹⁴, Mayumi Nish², Anders Hamsten¹⁵, Angela Silveira¹⁵, Alejandro M. Bertorello¹⁶, Kazuo Kitagawa⁴, Yasuo Nagaoka³, Hidehisa Kawahara³, Takeshi Tomonaga¹⁷, Tetsuji Naka¹⁸, Shigeo Ikegawa⁸, Noriyuki Tsumaki^{5,19}, Junichiro Matsuda¹⁴, Hiroshi Takemori^{1*}

1 Laboratory of Cell Signaling and Metabolic Disease, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan, **2** Department of Anatomy, Nara Medical University, Nara, Japan, **3** Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University, Suita, Osaka, Japan, **4** Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **5** Department of Bone and Cartilage Biology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **6** Food and Nutrition, Senri Kinran University, Osaka, Japan, **7** Department of Laboratory Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **8** Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Osaka, Japan, **9** Department of Pathology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **10** Department of General Thoracic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan, **11** Frontier Medicine on Metabolic Syndrome, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan, **12** Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan, **13** Department of Pathology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan, **14** Animal Models for Human Diseases, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan, **15** Cardiovascular Genetics and Genomics, Atherosclerosis Research Unit, Karolinska Institutet, CMM, Karolinska University Hospital-Solna, Stockholm, Sweden, **16** Membrane Signaling Networks, Atherosclerosis Research Unit, Karolinska Institutet, CMM, Karolinska University Hospital-Solna, Stockholm, Sweden, **17** Laboratory of Proteome Research, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan, **18** Laboratory for Immune Signal, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan, **19** Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Kyoto, Japan

Abstract

Salt-inducible kinase 3 (SIK3), an AMP-activated protein kinase-related kinase, is induced in the murine liver after the consumption of a diet rich in fat, sucrose, and cholesterol. To examine whether SIK3 can modulate glucose and lipid metabolism in the liver, we analyzed phenotypes of SIK3-deficient mice. *Sik3*^{-/-} mice have a malnourished phenotype (i.e., lipodystrophy, hypolipidemia, hypoglycemia, and hyper-insulin sensitivity) accompanied by cholestasis and cholelithiasis. The hypoglycemic and hyper-insulin-sensitive phenotypes may be due to reduced energy storage, which is represented by the low expression levels of mRNA for components of the fatty acid synthesis pathways in the liver. The biliary disorders in *Sik3*^{-/-} mice are associated with the dysregulation of gene expression programs that respond to nutritional stresses and are probably regulated by nuclear receptors. Retinoic acid plays a role in cholesterol and bile acid homeostasis, whereas ALDH1a which produces retinoic acid, is expressed at low levels in *Sik3*^{-/-} mice. Lipid metabolism disorders in *Sik3*^{-/-} mice are ameliorated by the treatment with 9-cis-retinoic acid. In conclusion, SIK3 is a novel energy regulator that modulates cholesterol and bile acid metabolism by coupling with retinoid metabolism, and may alter the size of energy storage in mice.

Citation: Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, et al. (2012) Involvement of SIK3 in Glucose and Lipid Homeostasis in Mice. PLoS ONE 7(5): e37803. doi:10.1371/journal.pone.0037803

Editor: Jean-Marc A. Lobaccaro, Clermont Université, France

Received: February 10, 2012; **Accepted:** April 24, 2012; **Published:** May 25, 2012

Copyright: © 2012 Uebi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; Natural Scientists and the Strategic Project to Support the Formation of Research Bases at Private Universities; and a grant from the Sumitomo Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: takemori@nibio.go.jp

Introduction

Cholesterol has diverse functions in eukaryotes, e.g., as a cell membrane component and a source of hormones and bile acid (BA). Dysregulation of cholesterol metabolism is involved in a variety of disease, such as dyslipidemia, cardiovascular disease, and obesity [1]. The liver X receptor (LXR) is a nuclear receptor that binds to target DNA elements by forming a heterodimer complex with the retinoid X receptor (RXR) [2,3]. Excess cholesterol is sensed by LXRs as their ligands, and active LXR-RXR complexes promote the gene expression of cholesterol-

catabolic enzymes (e.g., cytochrome P450 family 7A [CYP7A], which catabolizes cholesterol to BA in the liver) and cholesterol transporters, e.g., ATP-cassette G5 (ABCG5) and G8 in the liver and ABCA1 in the peripheral tissues. LXR also up-regulates hepatic fatty acid (FA) synthesis by inducing the expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) [4].

BA is also multifunctional molecules with a role in the digestive tract. The impairment of bile flow by bile duct lesions and cholelithiasis causes the retention of excess amounts of BA (cholestasis) and leads to chronic hepatitis. The farnesoid X

receptor (FXR) senses BA as its ligand, forms a complex with RXR, and up-regulates gene expression to lower the level of BA in the liver [5] by inducing the bile salt export pump (BSEP) and small heterodimer partner (SHP), which suppresses *Cyp7a* expression [6]. Excess levels of the BA pool also enhance energy expenditure and suppression of FA synthesis [7]. Meanwhile, a reduction of the BA pool by the activation of FXR induces obesity and hyperglycemia [8], suggesting that cholesterol-BA homeostasis is important for lipid and glucose metabolism.

9-*Cis* retinoic acid (9-*cis*-RA), an endogenous RXR ligand, is synthesized from vitamin A [9]. Vitamin A deficiency or RXR inhibition results in reduced LXR and FXR activity, which can lead to hepatic cholestasis [1]. Conversely, dysregulation of the metabolism of vitamin A to 9-*cis*-RA induces resistance to diet-induced obesity and type 2 diabetes in mice [10]. Because vitamin A absorption by enterocytes requires BA, BA homeostasis is tightly coupled with vitamin A metabolism [11].

Salt-inducible kinase (SIK), a member of the 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)-related kinase family, has 3 isoforms and regulates gene expression in various cells [12]. For example, SIK1 inhibits steroidogenic gene expression in the adrenal glands and gluconeogenic gene expression programs in the liver by repressing the cAMP response element (CRE)-binding protein (CREB) transcription factor [13,14] [15–16]. Meanwhile, SIK2 suppresses insulin-dependent thermogenic gene expression in brown adipose tissue [17]. In addition, in mice with a disrupted *Sik2* gene, downregulation of SIK2 expression confers resistance to oxidative stresses after brain ischemia [18] and enhances melanogenesis in melanocytes after ultraviolet irradiation [19,20]. These SIK2-dependent physiological events are also explained by the modulation of CREB activity.

When CREB is phosphorylated at Ser133 in its kinase-inducible domain by upstream activating kinases, such as protein kinase A (PKA) and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase 1/IV (CaMKI/IV), it recruits coactivators, e.g., CREB-binding protein and p300 and induces CRE-dependent transcription [21]. The other CREB-specific coactivator, i.e., CREB regulated transcription coactivator (CRTC or TORC), also activates CREB in response to PKA and CaMKI/IV [22,23]. In contrast to CREB, CRTC is inactivated by phosphorylation and is sequestered in the cytoplasm of unstimulated cells [24]. SIK1 and SIK2 are among the CRTC kinases that are involved in SIK-mediated inhibition of CREB [25]. Recently, p300 was also reported to be a mediator of SIK signaling in hepatocytes [26]. SIK2 inhibits the coactivation activity of p300 by phosphorylating Ser89, which prevents carbohydrate response element-binding protein-dependent hepatic steatosis in mice.

In addition to CREB and p300 repression, SIK1 induces hypertrophic action in the muscles by inhibiting class 2a histone deacetylase (HDAC) and then upregulating MEF2C transcription activity [27]. Recently, SIK2 was also found to inactivate class 2a HDAC in *Drosophila*, which results in the accumulation of FA in the fat body of insects and confers resistance to starvation [28]. These observations suggest that like AMPK, SIK1 and SIK2 may play important roles in the regulation of metabolic or stress responses.

SIK3 is also capable of regulating CREB activity in cultured cells under overexpression [29] or *in vitro* conditions [30]. Recently, we found that mice with a disrupted *Sik3* gene showed dwarfism because of the impairment of chondrocyte hypertrophy during skeletal development, which was accompanied by disinactivation of class 2a HDAC in the cartilage [31]. However, SIK3 phenotypes in adult mice, especially those related to energy metabolism, have not yet been elucidated.

Here, we report the induction of *Sik3* mRNA in the mouse liver after the consumption of a high-fat diet supplemented with excess cholesterol. Phenotyping of adult *Sik3*^{-/-} mice suggested that SIK3 is a novel regulator of glucose-lipid metabolism in the liver that maintains cholesterol-BA homeostasis along with the regulation of lipid storage size.

Results

Sik3^{-/-} Mice Exhibit a Lipodystrophic Phenotype

Factors affecting body size and longevity in model organisms, such as *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila*, often play important roles in the regulation of energy metabolism in mammals. The same may hold true for SIK. The *C. elegans kin-29* (ortholog of SIK) mutant shows increased longevity and small body size [32], while *Drosophila* expressing reduced levels of SIK2 acquired resistance to oxidative stress and starvation [33]. We also found that *Sik2*^{-/-} mice show resistance to brain ischemia [18]; however, *Sik2*^{-/-} mice are apparently normal in terms of body weight regulation [19].

To reevaluate individual SIK isoforms in the regulation of nutrient metabolism, normal C57BL/6J mice were fed with a variety of diets, and we examined their mRNA levels were examined. Interestingly, *Sik3* mRNA was strongly induced in the livers of the mice fed a high-fat/high-sucrose/high-cholesterol (HF/HS/HChol) diet. This up-regulation was accompanied by the induction of mRNA for metabolic enzymes such as *Fa synthase* (*Fasn*) and *Cyp7a* (Figure 1A). These results led us to investigate of the metabolic profiles of *Sik3* knockout mice [31].

Although *Sik3*^{-/-} mice were indistinguishable from wild-type mice just after birth, most of the knockout (KO) mice died on the first day (Figure S1A). Caesarean delivery failed to prevent the early death of *Sik3*^{-/-} mice. Because *Sik3*^{-/-} mice had skeletal abnormalities, their early death was probably due to respiratory failure caused by thoracic dystrophy [31]. However, the transgenic expression of SIK3 in the cartilage of *Sik3*^{-/-} mice failed to prevent their early death despite its correction of the skeletal abnormalities (no *Sik3*^{-/-} mouse survived out of seventeen weanling mice derived from the matings between *Sik3*^{-/-} females and *Sik3*^{-/-} :: *Col11a2-hSik3* males).

The *Sik3*^{-/-} mice that survived the first day could be weaned (Figure S1B), but their body weight was obviously less than that of the wild-type mice (male; Figure 1B). This was also the case with the females. We dissected 1-year-old mice and found that the lean phenotype of *Sik3*^{-/-} mice was attributed to the liver and adipose tissues, especially mesenteric and perirenal fat (Figure 1C and D). Small but substantial amounts of gonadal and subcutaneous fat and brown adipose tissue were observed in *Sik3*^{-/-} mice. Hematoxylin and eosin (HE) staining suggested that the small fat pads were probably due to the small size of the adipocytes (Figure 1E and S1C). The low levels of liver TG in *Sik3*^{-/-} mice might have prevented the development of fatty liver (Figure 1E and F), while total cholesterol levels were low in the serum of *Sik3*^{-/-} mice. Fast protein liquid chromatography (FPLC) analysis of serum lipids indicated that *Sik3*^{-/-} mice exhibited hypo-high density lipoprotein (HDL) cholesterolemia (Figure 1G).

To elucidate the causes of the lipodystrophic phenotype of *Sik3*^{-/-} mice, we compared the energy balance between wild-type and *Sik3*^{-/-} mice. *Sik3*^{-/-} mice consumed more food than the wild-type mice (Figure 1H), while the rate of digestion and absorption in the intestine appeared normal (Figure S1D). The rectal temperature of *Sik3*^{-/-} mice was higher than that of the wild-type mice (Figure 1I), which might correlate with the high levels of the O₂ consumption (VO₂: voluntary O₂ consumption)

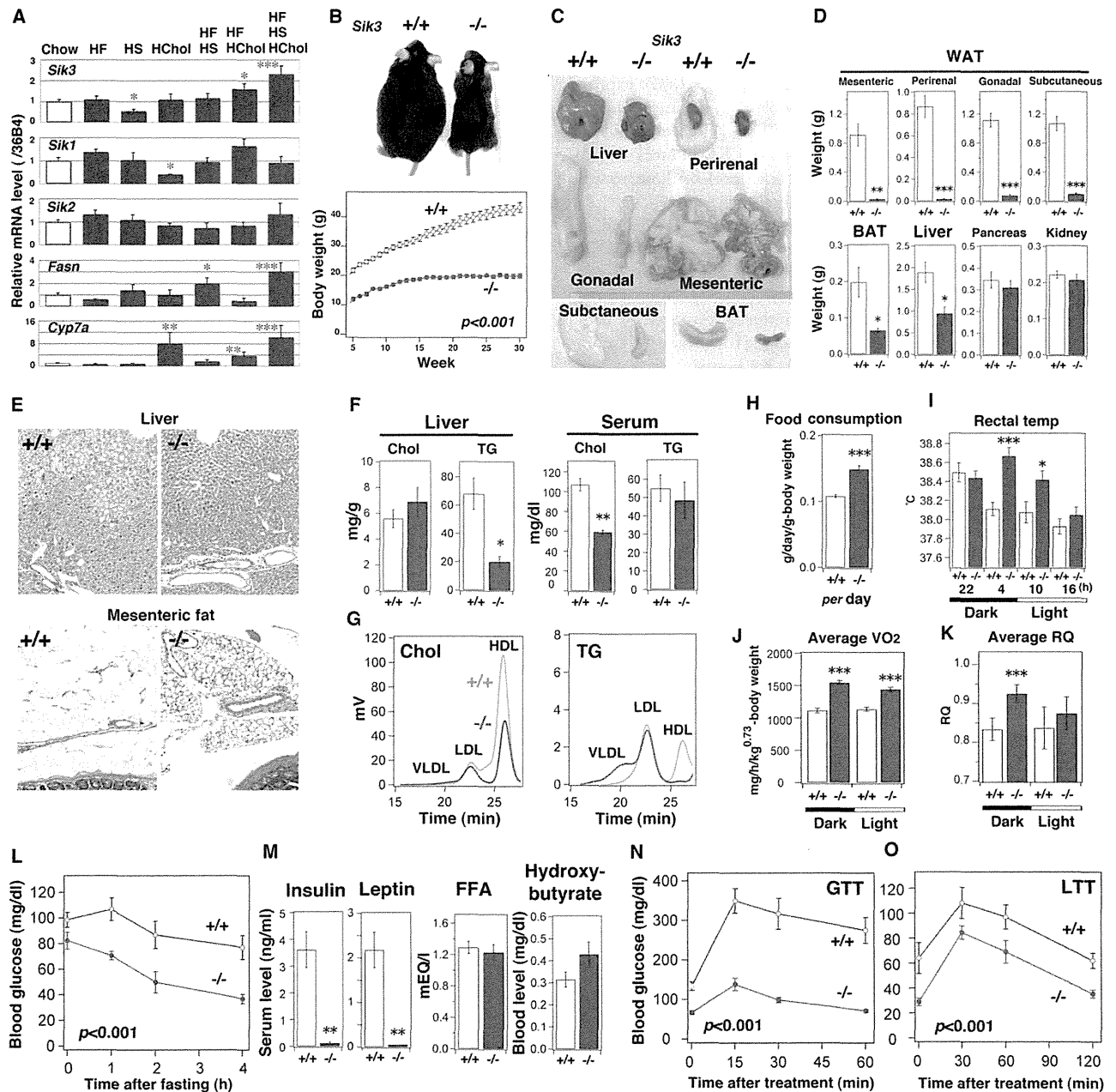


Figure 1. *Sik3*^{-/-} mice are lean, hypolipidemic, and hypoglycemic. (A) C57BL/6 mice (male; n=4) were fed various diets (HF, high fat; HS, high sucrose; HChol, high cholesterol) for 2 weeks, and liver mRNA was examined by quantitative PCR. *, **, and *** indicate $p < 0.05$, < 0.01 , and < 0.001 , respectively. Means and SEM are shown. (B) The body weight of male mice (n=6) was monitored. All data points show $p < 0.001$. (C) One-year-old male mice (n=5) were sacrificed (scale: 1 mm), and the indicated tissues were weighed (D). (E) Histology of liver and mesenteric fatty tissue is shown. Each magnification is the same. (F) Cholesterol (Chol) and triglycerides (TG) in the liver and serum were measured (n=5). (G) Serum cholesterol and TG were separated using FPLC. (H) The food consumption of each group (n=12). (I) Rectal temperature (n=12). (J) Oxygen consumption (VO_2 , voluntarily O_2 consumption) and (K) average respiratory quotient (RQ) during the day and night (n=5). (L) Mice (n=5) were fasted and their blood glucose levels were monitored at the indicated time points. All data points show $p < 0.001$. (M) After 4-h fasting, the serum levels of insulin, leptin, free fatty acid (FFA), and β -hydroxybutyrate were measured. (N) After 4-h fasting, glucose (1.5 g/kg) was intraperitoneally injected (GTT, glucose tolerance test) and blood glucose levels were monitored (n=5). (O) After 24-h fasting, lactate (1.5 g/kg) was injected intraperitoneally (LTT, lactate tolerance test; n=5). doi:10.1371/journal.pone.0037803.g001

observed in *Sik3*^{-/-} mice (Figure 1J). The high respiratory quotient (RQ) value of the *Sik3*^{-/-} mice was well explained by the insufficient fat storage followed by reduced fat utilization observed in these mice (Figure 1K). These results suggested that the

lipodystrophic phenotype of *Sik3*^{-/-} mice might be a result of their high rates of energy consumption.

We also examined secondary parameters such as blood glucose levels. In the fed condition, the *Sik3*^{-/-} mice had slightly lower

blood glucose levels than the wild-type mice, and the levels quickly decreased after fasting (Figure 1L). After a 4-h fast, the *Sik3*^{-/-} mice had significantly lower serum insulin and leptin levels than the wild-type mice (Figure 1M), while no obvious differences were observed in free FA or ketone body (β -hydroxybutyrate) levels. Given the enhanced food-consumption of *Sik3*^{-/-} mice, the apparently enhanced insulin- and leptin-action may be restricted to the peripheral tissues. Although we suspected thyrotoxicosis, the levels of circulating thyroid hormones did not differ between the 2 genotypes (Figure S1E).

Sik3^{-/-} mice exhibited enhanced glucose tolerance (GTT) (Figure 1N). When *Sik3*^{-/-} mice were treated with insulin (ITT), their blood glucose levels decreased like those of the wild-type mice (Figure S1F). Once the *Sik3*^{-/-} mice were supplied exogenously with an energy source, such as lactate (lactate tolerance test), they were able to produce glucose efficiently (Figure 1O), suggesting that the hypoglycemia of *Sik3*^{-/-} mice may be due to a lack of energy storage followed by an enhanced insulin response. This was also the case under the high-fat diet feeding condition (Figure 2A–J). Of particular note is that accumulation of cholesterol was suppressed in the livers of *Sik3*^{-/-} mice (Figure 2I), and the ratio of LDL-cholesterol to HDL-cholesterol was decreased in the serum of *Sik3*^{-/-} mice with a reduction of TG content in the very low-density lipoprotein (VLDL) fraction (Figure 2J).

Which tissue is responsible for the phenotypes of the *Sik3*^{-/-} mice? To address this question, we measured the body weight of heterozygous (*Sik3*^{+/-}) mice. The body weight curve of the *Sik3*^{+/-} mice overlapped with that of the wild-type mice (Figure S2A). Curiously, the mRNA and protein levels of SIK3 in the livers of *Sik3*^{+/-} mice were as high as those in wild-type mice (Figure S2B), though the specific levels of *Sik3* mRNA did not differ between parenchymal and non-parenchymal cells (Figure S2C). Given that parenchymal cells are the major population of the liver, we surmised that the liver, probably parenchymal cells, may be one of the responsible tissues/cells for the phenotypes of the *Sik3*^{-/-} mice.

Mice with disrupted genes for *Mark2* [34] or *Mark3* [35], which are other members of the AMPK family, have been found to be resistant to diet-induced obesity due to enhanced glucose-utilization in the brown adipose tissue. However, the mRNA expression levels of genes related to energy expenditure, such as *Ppargc1a* and *Ucp1*, in brown adipose tissue were not different between wild-type and *Sik3*^{-/-} mice.

Moreover, an *in vitro* adipocyte differentiation experiment using gonadal fat indicated that the preadipocytes of *Sik3*^{-/-} mice possessed a higher capability to differentiate into adipocytes than those from wild-type mice (Figure S2D), which might correlate with the high serum level of adiponectin in *Sik3*^{-/-} mice (Figure S2E). Given the expression level of *Sik3* mRNA (Figure S2B), we surmised that the lipodystrophic phenotype of *Sik3*^{-/-} mice might be caused by the impairments of the liver rather than the adipose tissues.

Signaling States in the Livers of *Sik3*^{-/-} Mice

The gene expression profile of the liver (Figure 3A) indicated that the pathway from glycolysis to FA synthesis was down-regulated in *Sik3*^{-/-} mice, while the glyconeogenic pathway was up-regulated. *Sik3*^{-/-} mice expressed high levels of *Fgf21* mRNA, suggesting an adaptive response to starvation; however, its promoting pathway, *i.e.*, the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) pathway, was down-regulated. Lack of FA storage and the uncoupling of FGF21 from the PPAR α pathway in *Sik3*^{-/-} mice may result in the failure to induce β -oxidation followed by ketogenesis [36].

We also examined the state of signaling molecules. The high level of PGC-1 α protein in the liver of *Sik3*^{-/-} mice was accompanied by the dephosphorylation of CRTC2 (Figure 3B) despite there being no significant difference in the status of CREB. Interestingly, the level of another CRTC2 kinase, AMPK [15], and of its activated phosphorylated form (pThr172) were also high in the livers of *Sik3*^{-/-} mice. Immunohistochemical analyses revealed the enhanced accumulation of CRTC2 in the nuclei of *Sik3*^{-/-} mice hepatocytes (Figure 3C). In addition, HDAC5, another SIK/AMPK substrate [37,38], also accumulated in the nuclei of liver cells in *Sik3*^{-/-} mice, suggesting that AMPK is unable to compensate for the deficiency of SIK3 in hepatocytes.

Sik3^{-/-} Mice are Unable to Adapt to Cholesterol

Adiponectin had been found to promote fat accumulation in adipose tissues and to improve insulin sensitivity in leptin-resistant mice [39], which could explain the hypoglycemic phenotype of *Sik3*^{-/-} mice, but not their lipodystrophy. What are the unknown factors? Interestingly, little, if any, changes were found in the mRNA levels of the cholesterol and BA metabolic genes in *Sik3*^{-/-} mice (Figure 3A) and irregular expression patterns were observed, *i.e.*, *ApoA1* and *Abcg5* were up-regulated, while *Cyp8b* was strongly suppressed. Moreover, hepatic *Sik3* mRNA expression is induced by a high-fat diet supplemented with high-cholesterol (Figure 1A). Therefore, we decided to examine effects of cholesterol (with fat) on *Sik3*^{-/-} mice by challenging the mice with a high-cholesterol diet (HF/HS/HChol).

After 4 months, the wild-type mice developed fatty liver, while the livers of *Sik3*^{-/-} mice had surface asperity and turned yellow (Figure 4A). HE staining revealed the enhanced formation of a dilated canalicular structure in the livers of *Sik3*^{-/-} mice (Fig 4B, *upper and lower left*), and these structures were highly positive for BSEP-immunoreactive signals (*green signals* in Figure 4B *lower right*). Liver and serum lipid levels were increased after feeding with the HF/HS/HChol diet; however, they were not significantly different from the levels observed when wild-type and *Sik3*^{-/-} mice were fed a chow diet (compare Figure 1F to Figure 4C). The ratio of LDL-cholesterol to HDL-cholesterol in *Sik3*^{-/-} mice was reversed after feeding with the cholesterol-containing diet (compare Figure 1G to Figure 4D), and was accompanied by an increase in TG content in the LDL fraction in *Sik3*^{-/-} mice.

The fluctuations in serum alanine amino transferase (ALT) levels suggested that the livers of *Sik3*^{-/-} mice were damaged soon after feeding and lost their normal function, *e.g.*, ALT production, after 5 weeks (Figure 4E). While liver injury in the wild-type mice progressed gradually, probably due to fatty liver, the degree of latent liver injury after 4-month of receiving the high-cholesterol diet was higher in *Sik3*^{-/-} mice, possibly because of the higher mRNA expression levels of inflammatory factors in the livers of *Sik3*^{-/-} mice (Figure 4F).

To focus on effects of cholesterol alone, *Sik3*^{-/-} mice were challenged with a high-cholesterol (2%) diet according to the same schedule as the HF/HS/HChol diet. The liver abnormalities of *Sik3*^{-/-} mice were barely visible on the surface (Figure 5A); however, a number of foci that were negative for eosin-staining (Figure 5B, *arrows*) were detected in the livers of *Sik3*^{-/-} mice. These foci might be enriched in cholesterol derivatives, because we observed strong autofluorescence in the frozen sections (Figure 5B *lower right*), and the level of hepatic cholesterol was higher in *Sik3*^{-/-} mice than in wild-type mice (Figure 5C). A small numbers of dilated canalicular structures were again observed in the *Sik3*^{-/-} mice liver (Figure 5B *lower left*).

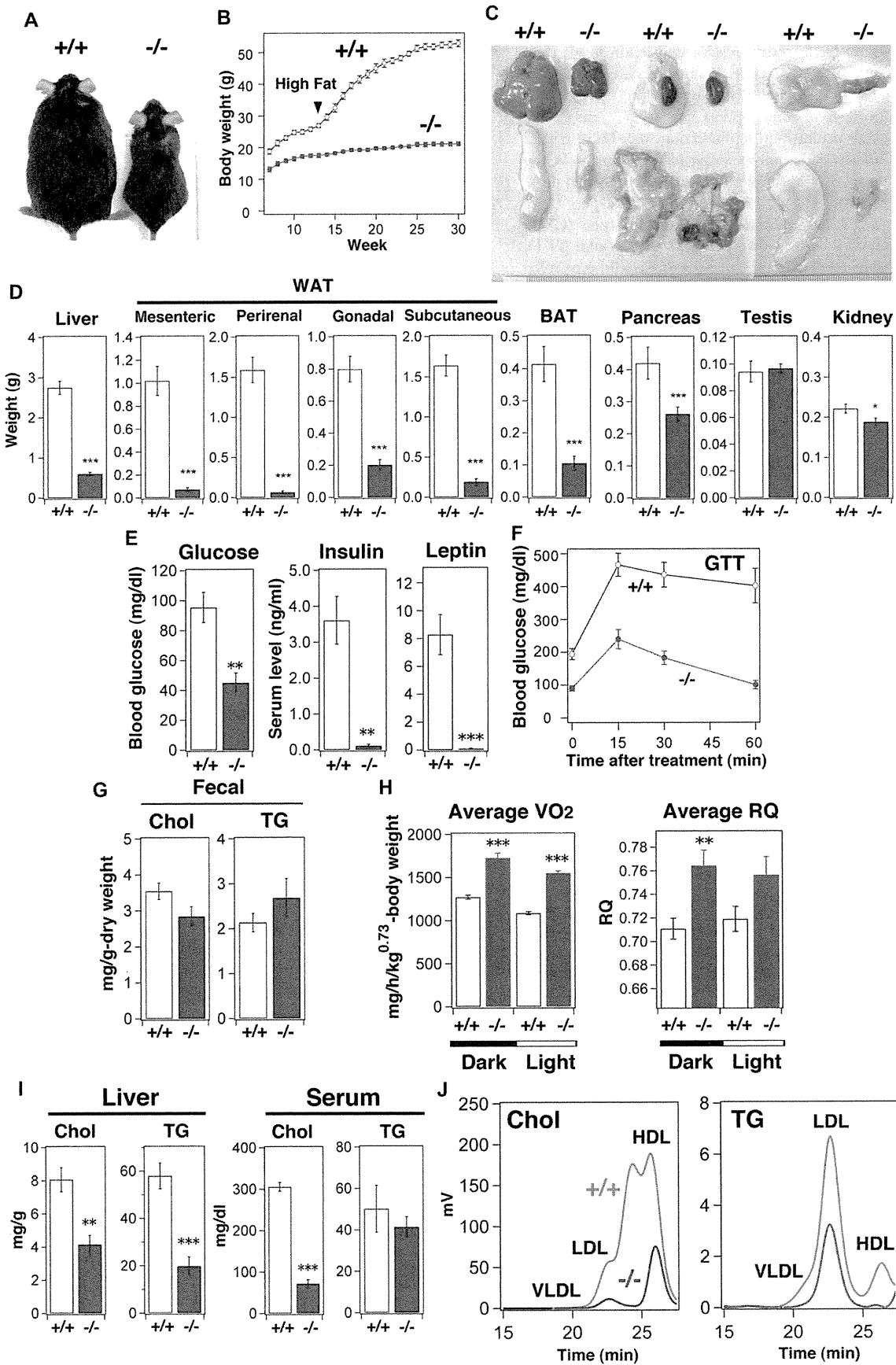


Figure 2. *Sik3*^{-/-} mice are resistant to a high-fat diet. (A) A representative image of male mice after high-fat (60% of calories) feeding. Mice (n=6) were fed with a high-fat diet for 12–30 weeks and their body weights were monitored every week (B). Means and SEM are shown. All data points indicate *p*<0.001. (C) Representative photos of tissues (scale, 1 mm). (D) Tissue weights are shown. *, **, and *** indicate *p*<0.05, <0.01, and <0.001, respectively. (E) Levels of blood glucose, insulin, and leptin measured after 4-h fasting. (F) Glucose tolerance test (1.5 g/kg) performed after 4-h fasting. (G) Cholesterol and triglyceride content in feces (n=3 cages). (H) Oxygen consumption (VO₂, voluntarily O₂ consumption) of each group (n=6) was monitored. Respiration quotient (RQ) during the day and night. (I) Cholesterol (Chol) and triglycerides (TG) in the liver and serum were measured (n=6). (J) Serum Chol and TG were separated using FPLC.

The patterns of serum lipids in *Sik3*^{-/-} mice fed with the high-cholesterol diet were almost the same as those of *Sik3*^{-/-} mice fed with the HF/HS/HChol diet. Liver injury in *Sik3*^{-/-} mice progressed gradually (Figure 5E), and we observed high mRNA expression levels of inflammatory factors in the liver of *Sik3*^{-/-} mice (Figure 5F).

Why were the livers of *Sik3*^{-/-} mice injured after the consumption of the high-cholesterol diet? Are there any hints to explain the lipodystrophic phenotype of these mice? To address these questions, we reevaluated blood biochemical markers for the liver and biliary duct systems. Even when *Sik3*^{-/-} mice were fed a chow diet, their serum ALT levels gradually increased with age (Figure 6A). However, the high-fat diet (as evidenced by the dissection of a 30-week-old mouse) protected the livers of *Sik3*^{-/-} mice from the injuries caused by aging as well as by fatty liver. Conversely, once cholesterol is added to the diet, this protection may become invalid. As the serum alkaline phosphatase (ALP) and BA levels were continuously high in *Sik3*^{-/-} mice, except when under the high-fat diet, we hypothesized that the dysregulation of BA metabolism followed by hepatic cholestasis (Figure 6B) might be the cause of the hepatic injuries.

In addition, to test whether high levels of BA could suppress body weight gain, the mice were fed a high-cholic acid (CA) diet for 1 month. As shown in Figure 6C, the high-CA diet completely suppressed the weight gain of wild-type mice and reduced the body weight of *Sik3*^{-/-} mice, suggesting that dysregulation of BA metabolism might be one of the causes of the lipodystrophic phenotype of *Sik3*^{-/-} mice.

***Sik3*^{-/-} Mice are Unable to Adapt to CA**

To examine the details of the dysregulation of BA metabolism in *Sik3*^{-/-} mice, we dissected these mice. Their gallbladders of *Sik3*^{-/-} mice were enlarged, and their livers had become yellow-brown (Figure 7A). HE staining identified hypertrophic hepatocytes with lipid droplets (Figure 7B). The gallbladders of *Sik3*^{-/-} mice (Figure 7C) were accompanied by hyperplastic mucosal epithelia (Figure 7E).

The volume of bile in the gallbladders of *Sik3*^{-/-} mice was large, but its color was light (Figure 7D). A good amount of bile sand was also found in the gallbladders of *Sik3*^{-/-} mice (Figure 7D, right). Like FXR-KO mice [40], the deposition of bile sand might be a result of the presence of cholesterol crystals

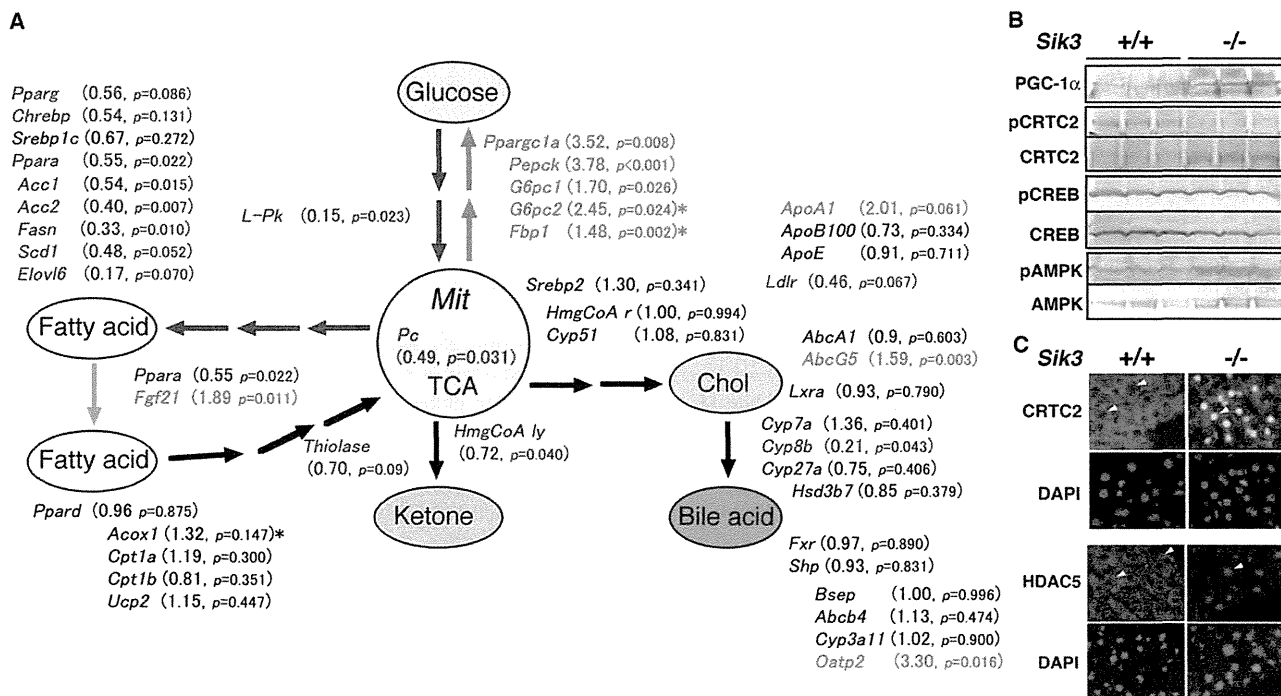


Figure 3. Gene expression profile in the liver. (A) One-year-old male mice (n=5) were fasted for 4 h, and the liver mRNA levels were measured using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Red and blue indicate the up- and down-regulated genes in *Sik3*^{-/-} mice, respectively. +, fold increase; -, fold decrease. The threshold is set at *p*=0.1. The values marked with an asterisk (*) were obtained using PCR-array kits (n=3). The abbreviations for the genes and the PCR primers used are listed in Table S2. Mit, mitochondria; TCA, tricarboxylic acid cycle. (B) Intracellular signaling molecules and their activation status in the liver were examined by western blot analysis. (C) Immunohistochemical analysis of SIK3 substrates (CRTC2 and HDAC5) in the liver.

doi:10.1371/journal.pone.0037803.g003