

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461339

研究課題名(和文) S100Bノックアウトマウスにおける耐糖能および細小血管障害の検討

研究課題名(英文) Glucose tolerance and microangiopathy in S100B-knockout mice

研究代表者

濱田 洋司 (Hamada, Yoji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：20293706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は糖尿病・肥満における全身の慢性炎症の新たなメディエータとして、S100B蛋白に着目したものである。S100Bノックアウトマウスを用いた検討により、高脂肪食負荷時に、S100BK0群は野生群に比べ、ブドウ糖負荷試験ではインスリン分泌の亢進と耐糖能の改善傾向、インスリン感受性の改善傾向、血清中性脂肪・レプチンの高値、肝臓の脂質・胆汁酸代謝に関連する分子の変動が見られた。以上の結果は、S100B蛋白が糖・脂質代謝に一定の役割を担っていることを示唆しており、今後S100Bを糖尿病・脂質異常症の新たな治療目標分子として展開できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the role of S100B protein as a novel mediator for whole body chronic inflammation seen in diabetes and obesity. We utilized S100B knockout mice to address the issue. The S100B knockout mice under high fat diet showed increased insulin secretion and tended to improve glucose tolerance during oral glucose challenge as compared with wild type mice. The insulin tolerance test revealed that the knockout mice were more insulin sensitive than the wild type mice. The knockout mice showed higher levels of serum triglycerides and leptin, and altered gene expression of enzymes related to lipid and bile acid metabolism. These novel findings indicate that S100B plays a tangible role in the metabolism of glucose and lipids, and thus S100B warrants further investigation as a novel target for the treatment of diabetes and dyslipidemia.

研究分野：代謝学

キーワード：S100B 肥満 脂肪組織 インスリン抵抗性 糖尿病 脂質異常

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病あるいは肥満においては、多臓器で軽度の慢性炎症が生じていることが知られている。内臓脂肪における慢性炎症はインスリン抵抗性を惹起し (*Arterioscl Throm Vas Biol* 25:2062-2068, 2005)、神経や腎、血管壁などにおける炎症は糖尿病細小血管障害や動脈硬化の誘因となりうる。

この炎症機序として様々なサイトカインや遊離脂肪酸の関与が報告されてきたが、今回我々は、慢性炎症の新たなメディエータとして S100B 蛋白に着目した。S100B は Ca 結合蛋白として細胞内で多様な反応に関与する一方、分泌蛋白として機能する。S100B は単球や星状細胞において AGE 受容体 (RAGE) のアゴニストとして TNF- $\alpha$  分泌を亢進させ (*J Neuroimmunol* 184:214-22, 2007)、また血管内皮細胞において多彩な炎症性変化を誘導することが知られている (*Diabetes* 53:743-51, 2004)。S100B は中枢神経においては星状細胞やミクログリアから分泌されて中枢神経系の炎症に関与し、神経変性疾患やうつ病、統合失調症などの発症進行に寄与することが示唆されている (*J Psychiatr Res* 35:11-14, 2001)。

一方、S100B は脂肪細胞および末梢神経シュワン細胞からも豊富に分泌されている。興味深いことに、肥満度と血中 S100B 濃度は正相関することが報告されている (*Psychoneuroendocrinol* 35:321-4, 2010)。また糖尿病患者あるいは糖尿病動物の脂肪組織や神経系において、S100B 蛋白発現が増加していることを示す複数の成績がある (*Endocrinology* 138:5176-83, 1997、*Neurosci Lett* 24:181-5, 2008、*Diabetologia* 53:2656-66, 2010)。これらの成績は、糖尿病や肥満に見られる慢性炎症に、S100B が関与する可能性を示唆している。特に分泌細胞である脂肪細胞とシュワン細胞においては、中枢神経系と同様に局所的な濃

度が高く、より炎症を惹起しやすいと推測される。

脂肪組織の慢性炎症は脂肪細胞におけるインスリン感受性低下のみならず、脂肪細胞から分泌される TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインおよび遊離飽和脂肪酸が門脈を通じて肝に達することで、肝におけるインスリン抵抗性を惹起する。肥満・糖尿病で増加した脂肪細胞由来の S100B はこれを増悪させるだけでなく、自らが門脈を介して肝に運ばれ、肝において炎症の一因になる可能性も想定される。

また糖尿病性末梢神経障害では神経組織へのマクロファージの浸潤など炎症性機序が示唆されている (*J Neurochem* 104:1471-59, 2008、*Brain Res* 1373:172-82, 2011)。近年、末梢神経障害は肥満者や軽度の耐糖能異常者、メタボリックシンドローム有所見者に高率に存在することが知られている (*J Periph N Sys* 10:354-9, 2005; *J Neurol Sci* 242:9-14, 2006)。我々は、飽和脂肪酸がこれら疾患において神経障害の原因になりうることを報告している (*Neuroscience* 176:188-98, 2011) が、これらの病態に共通して増加している S100B も炎症促進を介して神経障害に関与することは十分考えうることである。

また腎症・網膜症さらには大血管障害においても発症に RAGE の関与が示唆されている。特に腎症については糖尿病のみならず肥満でも腎障害が生ずることが知られていることから、増加した血中 S100B が RAGE を介して臓器障害を惹起する可能性が想定される。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで、S100B 分泌がカテコラミンで促進されインスリンで抑制されること、脂肪細胞とマクロファージの相互作用にはメディエータとして S100B が関与することを報告してきた。またメタボリックシンドローム有所見者の血清 S100B が健常者に比べ高値

であることも確認している。

本研究において解明を試みた課題は、S100B の欠損が耐糖能および細小血管障害の発症におよぼす影響である。すなわち、(1) 高脂肪食負荷時に S100B ノックアウトマウスの耐糖能、インスリン抵抗性およびエネルギー代謝、脂肪・肝における炎症がどのように変化するのか、(2) 薬剤もしくは高脂肪食負荷による糖尿病誘発時に、S100B ノックアウトマウスの細小血管障害がどのように発症進展するのか、を野生型マウスと比較検討し明らかにすることを旨とした。

具体的な目的として、(1) 高脂肪食負荷状態におけるブドウ糖負荷試験・インスリン負荷試験・インスリンクランプによる耐糖能・インスリン感受性、肝・脂肪組織の組織学的炎症所見とサイトカイン・糖代謝系の遺伝子発現変化、(2) 糖尿病誘発後の末梢神経・腎の組織学的検討とサイトカイン発現、各種神経機能および尿蛋白排泄量の変化、につきそれぞれ評価を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 肥満・糖脂質代謝に対する S100B の関与の検討

S100B ヘテロノックアウトマウスを購入して掛け合わせ S100B ホモノックアウトマウス (S100BK0) を得た。雄 S100BK0 マウス・野生型 C57B6J マウスを高脂肪食群および通常食群に分け、6~12 週間飼育し体重および摂餌量を観察した。飼育 5 週あるいは 10 週目に空腹血糖値、経口ブドウ糖負荷試験 (2g/kg)、さらにインスリン負荷試験 (0.6U/kg) の評価を行った。また 12 週終了後に深麻酔科で静脈血、副睾丸周囲脂肪組織、肝臓、膵臓、下腿筋を採取した。得られた検体を遺伝子解析 (DNA アレイ解析および定量 PCR)、サイトカイン測定 (マルチプレックスアレイおよび ELISA)、脂質測定、組織学的評

価に供した。

(2) 糖尿病細小血管障害に対する S100B の関与の検討

S100B ノックアウトマウスおよび野生型マウスにストレプトゾトシンを腹腔内注射して糖尿病を誘発した。非誘発コントロール群とともに通常食にて 3 ヶ月飼育し、神経機能および尿蛋白量を検査するとともに、神経・腎の組織学的所見、サイトカイン発現、および合併症に関与する代謝ストレス指標を評価する。

### 4. 研究成果

高脂肪食負荷状態下において、S100BK0 群は野生群に比べ、以下の所見を示した。

(1) 体重増加および摂餌量は差を認めなかった、(2) ブドウ糖負荷試験では耐糖能の改善傾向が見られたが有意ではなかった、(3) 空腹時およびブドウ糖負荷時のインスリン分泌 (負荷後 15 分) は、高脂肪食負荷 6 週目において K0 群で有意に高値であった (図 1A および 1B)、(4) インスリン負荷試験では、インスリン感受性の改善傾向が見られたが有意差は認めなかった、(5) 血清脂質の検討では、中性脂肪 (総 TG, CM-TG, VLDL-TG) が有意に高値であった、(6) 高脂肪食負荷 6 週目でレプチンが高値を示した、(7) 肝臓の遺伝子発現では ELOVL7, 3, FAS, Slco1a1, Cyp7b1, Ces1G など脂質・胆汁酸代謝に関連する分子の変動が見られた、(8) 各臓器の組織学的の検討では明らかな組織形態の差を認めなかった。

一方、通常食飼育下では、両群間でこれらの観察項目に差を認めなかった。

図 1 A

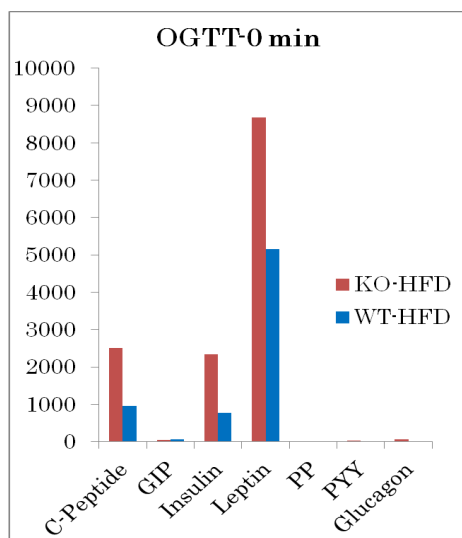
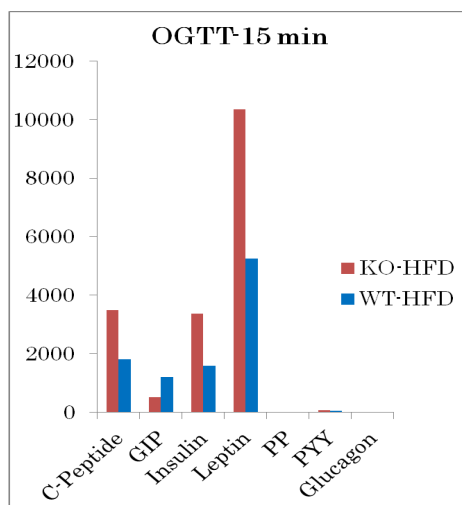


図 1 B



以上の結果は、S100B 蛋白が糖・脂質代謝に一定の役割を担っていることを示唆している。S100B は従来、神経系で炎症に関与することが知られており、我々は脂肪細胞・マクロファージ相互作用においても S100B が炎症惹起因子として作用する可能性を報告しているが、今回のノックアウトマウスの検討により、生体における S100B の糖・脂質代謝への関与が示された。この結果は、培養筋細胞実験において S100B が筋細胞の糖代謝に影響するという我々の結果（発表予定）にも合致するものである。この S100B の作用は新しい知見であり、今後 S100B を糖尿病、さら

には高脂血症の新たな治療目標分子として展開できる可能性がある。

一方、当初想定された、体重増加や脂肪細胞肥大、肥満関連遺伝子に対する S100B の関与は証明できなかった。このことは、培養脂肪細胞・マクロファージを用いた実験で認められた S100B の炎症惹起作用は、生体において必ずしも肥満助長の有力因子ではないことを示唆している。

二つ目の課題である糖尿病細小血管障害に対する検討については、S100BKO マウスを肥満・糖脂質代謝の実験に集中したため、予備実験に着手した段階である。今後、ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルを作成し、神経機能評価および末梢神経組織の生化学的・組織学的評価が必要であると考えられた。

#### 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 1 件)

Fujiya A, Nagasaki H, Seino Y, Okawa T, Kato J, Fukami A, Himeno T, Uenishi E, Tsunekawa S, Kamiya H, Nakamura J, Oiso Y, Hamada Y. The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Feb;22(2):371-9. doi: 10.1002/oby.20532 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

細川香里、村瀬正敏、前川龍也、清野祐介、濱田洋司、有馬寛 糖代謝に与える S100B 蛋白の作用について 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 28 年 5 月 19 - 21 日、京都府京都市 京都国際会議場

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

濱田 洋司 (HAMADA Yoji)  
名古屋大学・医学系研究科・特任准教授  
研究者番号：20293706

##### (2) 研究分担者

清野 祐介 (SEINO Yusuke)  
名古屋大学・医学系研究科・特任助教  
研究者番号：80354833