

## 主論文の要約

# The Role of S100B in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages

〔 脂肪細胞とマクロファージの相互作用における S100B 蛋白の役割 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ユタカ教授)

藤谷 淳

## 【緒言】

S100B は 21kDa のカルシウム結合蛋白で、中枢神経系細胞のアストロサイトから主に分泌される。細胞外 S100B は細胞膜に発現している RAGE (Receptor of advanced glycation endproducts) と結合することにより、炎症や神経の障害に関与している。近年 S100B は脂肪細胞からも分泌されること、および肥満患者で血清 S100B 濃度が高値であることが報告された。今回我々は、脂肪細胞とマクロファージの相互作用における S100B の役割を、成熟脂肪細胞に分化誘導させた 3T3-L1 (L1) と RAW264.7 マクロファージ (RAW) を共培養することにより検討した。

## 【方法】

RAW, L1 をそれぞれ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) で培養し、デキサメサゾン、3-isobutyl-1-methylxanthine およびインスリンを用いて L1 を脂肪細胞へ分化誘導し以下の実験に用いた。

- 1) 成熟脂肪細胞の S100B 発現および分化に伴う発現量、分泌量の変化を検討した。
- 2) RAW をリコンビナント S100B で刺激し TNF- $\alpha$  分泌、マクロファージ M1/M2 極性、および CCR2 発現の変化を検討した。
- 3) L1 を TNF- $\alpha$ , エピネフリンおよびインスリンで刺激し S100B 合成、分泌および遺伝子発現の変化を確認した。
- 4) RAW, L1 をそれぞれの培養上清で相互に刺激し、その作用を検討した。
- 5) RAW と L1 を cell culture insert® を用いて相互に接触しない条件下で共培養し、サイトカイン分泌における相互作用を検討した。
- 6) L1 への S100B siRNA 導入および RAW への RAGE 中和抗体処置後、RAW からの TNF- $\alpha$  分泌に対する L1 培養上清の作用を検討した。
- 7) C57/BL6 マウスの副睾丸周囲白色脂肪組織から脂肪細胞を、そして静脈血中からは EasySep® を用いて CD11b 陽性の単球を分離し初代培養した。単球において、S100B 刺激による TNF- $\alpha$  分泌量および M1/M2 マーカー発現量の変化を検討した。脂肪細胞に対しては、S100B 発現量および TNF- $\alpha$  刺激による S100B 分泌量の変化を検討した。

脂肪細胞の S100B 発現は蛍光免疫染色法を用いて検討した。S100B, TNF- $\alpha$ , MCP-1 濃度は sandwich ELISA 法で測定し、L1 からの遊離脂肪酸濃度は酵素法を用いて測定した。L1 細胞内 S100B 量は western blot 法および sandwich ELISA 法を用いて検討した。RAW, L1 の遺伝子発現は定量 PCR 法で検討した。統計学的処理は、各数値は mean  $\pm$  SEM で表記し、分散分析を用いて解析した。有意水準 5%未満をもって有意とした。

## 【結果】

- 1) 蛍光免疫染色法では、赤色蛍光で示すように L1 の細胞質に S100B の発現を強く認め(Fig. 1A), 定量 PCR 法でも S100B mRNA の発現を認めた(Fig. 1B). L1 からの

S100B mRNA 発現量は分化後間もなく減少したが、培養液中への分泌量の低下は mRNA 発現量の低下と比較すると緩徐であった(Fig. 1C).

2) S100B 蛋白は、RAW からの S100B mRNA 発現とともに培養液中への分泌量を濃度依存性に増加させ(Fig. 2A), マクロファージ M1 マーカー(F4/80, CD11b, CD11c, IL-1 $\beta$ , IL-6) および MCP-1 の受容体である CCR2 発現を増加させた(Fig. 2B).

3) TNF- $\alpha$  は L1 培養液中および細胞内 S100B 量を有意に増加させた(Fig. 3A, B). 一方で L1 の S100B mRNA 発現は TNF- $\alpha$  刺激により低下した(Fig. 3C). インスリンは L1 からの S100B 分泌を低下させ、エピネフリンは S100B 分泌を濃度依存性に増加させた(Fig. 3D). またインスリンは TNF- $\alpha$  やエピネフリンによる S100B 分泌増加を部分的に抑制した(Fig. 3E).

4) L1 からの S100B 分泌は RAW 培養上清による刺激で有意に増加し(Fig. 4A), RAW からの TNF- $\alpha$  分泌は L1 培養上清刺激により増加した(Fig. 4B). L1 をエピネフリンで前処置することにより, L1 培養上清による RAW からの TNF- $\alpha$  分泌増加作用は増強され, インスリンでの前処置により抑制された(Fig. 4B).

5) 脂肪細胞とマクロファージの共培養系において, RAW との共培養により培養液中の S100B 濃度は L1 単独培養での濃度と比較して有意に増加した(Fig. 5A). 一方 L1 の S100B mRNA 発現は低下した. 培養液中の TNF- $\alpha$  濃度は RAW 単独培養と比較して共培養では低下したものの, RAW の TNF- $\alpha$  mRNA 発現量は共培養により有意に増加した(Fig. 5B). RAW の M1 マーカー(F4/80, CD11c, IL-1 $\beta$  など)や CCR2 mRNA 発現もまた L1 との共培養により有意に増加し, 一方で M2 マーカーである CD206 の遺伝子発現は有意に低下した.

6) S100B siRNA の作用により L1 の S100B mRNA 発現は約 70%, S100B 分泌量は約 55%抑制されたが(Fig. 6A), マクロファージとの相互作用に影響を及ぼす可能性のある MCP-1 やパルミチン酸には影響を与えなかった(Fig. 6B). L1 培養上清刺激による RAW からの TNF- $\alpha$  分泌増加は, S100B siRNA を L1 に導入する事により部分的に抑制された(Fig. 6C). RAW を RAGE 中和抗体で前処置することにより AGEs の作用はほぼ完全に抑制され, リコンビナント S100B や L1 培養上清の作用は部分的に抑制された(Fig. 6D).

7) マウス静脈血から分離した単球においては, RAW と同様に S100B による刺激で TNF- $\alpha$  分泌量は増加し(Fig. 7A), M1 マーカー(TNF- $\alpha$ , CD11c, IL-1 $\beta$ ) mRNA 発現は増加した(Fig. 7B). 初代培養した脂肪細胞からの S100B 分泌量は TNF- $\alpha$  の刺激により増加し(Fig. 7C), S100B mRNA 発現は GAPDH で補正して MCP-1 mRNA 発現量と同程度であった(Fig. 7D).

## 【考察】

肥満患者では脂肪組織内へマクロファージが浸潤し、浸潤したマクロファージと脂肪細胞は TNF- $\alpha$ , MCP-1 や遊離脂肪酸を介して相互作用することで脂肪組織の慢性炎症を惹起すると考えられてきた. 本研究の結果から、脂肪細胞から分泌される

S100B は RAGE を介してマクロファージを活性化し炎症性サイトカイン分泌を増加させ、一方マクロファージから分泌される TNF- $\alpha$  により脂肪細胞からの S100B 分泌が増加することが明らかとなった。このことは、脂肪細胞とマクロファージが相互作用することにより、両細胞は S100B と TNF- $\alpha$  を介してパラクリンループを形成し脂肪組織の慢性炎症を増悪させる可能性を示唆している。

本研究では過去の報告と同様に、S100B 分泌はエピネフリン刺激で増加し、インスリンの作用により減少した。S100B 分泌はグルカゴン、イソプロテレロール、細胞膜透過性 cAMP アナログである dibutyryl-cAMP により増加するとの報告があり、細胞内 cAMP 濃度が S100B 分泌調整に関与している可能性が示唆されている。肥満やメタボリック症候群、2 型糖尿病の状態では血中のカテコラミンやグルカゴン濃度は増加し、脂肪組織でのインスリン作用は減弱していることから、本研究結果は肥満患者における血清 S100B 濃度の増加や BMI との相関関係を説明しうるものである。また S100B は増加した遊離脂肪酸や TNF- $\alpha$  とともに、肥満患者における脂肪組織の慢性炎症を担っていると考えられる。

#### 【結語】

本研究は炎症性アディポカインとしての S100B の機能を明らかにした。肥満やメタボリック症候群、2 型糖尿病における S100B 蛋白の重要性の解明のために、今後 *in vivo* および臨床研究の蓄積が必要である。