

様式 C 18

# 研究成果報告書

---

糖毒性の不可逆性を生み出す新たな分子治療標的の解明

---

18390100

平成18年度—平成19年度科学研究費補助金

( 基盤研究 (B) ) 研究成果報告書

平成20年 6月

研究代表者 小島 秀人

滋賀医科大学医学部准教授

滋賀医科大学附属図書館



2007015791

## <はしがき>

2型糖尿病はインスリン分泌障害と末梢組織のインスリン抵抗性を特徴とし、一旦発症すると進行性で自然治癒は望めない。全世界をあげての研究努力にもかかわらず、完治させる治療法のめどは立っていない。その原因の一つとして、糖毒性により生じるとされる不可逆性病態のメカニズムが特定されていないことがあげられる。

我々は糖尿病合併症の出現に重要な役割を持つ異常骨髄細胞の存在を独自に発見し報告した。この異常細胞は、糖毒性により骨髄内で生み出され、末梢臓器へと遊走し、臓器細胞に対し細胞融合により本来発現するはずのない遺伝子を強制導入し、臓器の正常な遺伝子発現を混乱状態に陥れるという、まさに不可逆性の病態を生じさせる本体そのものであった。従って、この現象こそが糖尿病が治癒しない根本的な原因の一つではないかと考えた。

本研究は全体構想として、異常骨髄細胞の出現メカニズムとその役割を明らかにして、国家的課題である2型糖尿病の完治に向けた突破口の開拓を目的とする。具体的な課題として、糖尿病発症の代表的な環境負荷である歪んだ食生活に焦点を当て、高脂肪高糖質食負荷マウスと遺伝的欠損により過食とインスリン抵抗性を持つdb/dbマウスの2種類の肥満2型糖尿病モデルマウスを用いて以下の検討を行った。

- 1) 高血糖で異常骨髄細胞が生み出されるしくみの解明。
- 2) 異常骨髄細胞が病態の不可逆性を作り出す手段の特定。
- 3) 異常骨髄細胞の除去と糖尿病による不可逆性からの脱却法の提示。

現行の糖尿病治療法では、血糖コントロールはできても、治癒させることはできない。不可逆性の病態を作り出す主役とも言える異常骨髄細胞の全体像を、隠れ蓑となっている臓器再生ネットというベールをはぎ取り、この異常な細胞集団を駆除することにより糖尿病状態を元に戻し、2型糖尿病の完治に向けた治療標的であることを示すことを目的とした。

## 研究組織

研究代表者	小島 秀人	(滋賀医科大学医学部准教授)
研究分担者	木村 博	(滋賀医科大学医学部教授)
研究分担者	藤宮 峯子	(滋賀医科大学医学部准教授)

**交付決定額（配分額）**

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
平成19年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

## 研究発表

### (1) 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名等)

【雑誌論文】 計 (5) 件

著者名	論文標題				
Kojima H, Fujimiya M, Terashima T, Kimura H, Chan L	Extrapancreatic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: Is history repeating itself?				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Endocrine Journal	無し	53	2016	715-722	

著者名	論文標題				
小島秀人、木村博、藤宮峯子、柏木厚典	肝・骨髄幹細胞からの再生				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Diabetes Frontier	無し	17	2016	319-323	

著者名	論文標題				
Fujimiya M, Kojima H, Ichinose M, Arai R, Kimura H, Kashiwagi A, Chan L	Fusion of proinsulin-producing bone marrow-derived cells with hepatocytes in diabetes				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Proceedings of National Academy of Science of the United States of America	有り	104	2017	4030-4035	

著者名	論文標題				
Oi J, Terashima T, Kojima H, Fujimia M, Maeda K, Arai R, Chan L, Yasuda H, Kashiwagi A, Kimura H	Isolation of specific peptides that home to dorsal root ganglion neurons in mice				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Neuroscience Letters	有り	434	2018	266-272	

著者名	論文標題				
小島秀人、木村博	膵および膵外におけるNgn3とNeuroD1の発現調節と機能				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
内分泌・糖尿病科	無し	26	2018	141-147	

(2) 学会発表（発表者名、発表標題、学会等名等）

〔学会発表〕計（1）件

発表者名	発表標題	
小島秀人、大井二郎、寺島智也、 前田健吾、藤宮峯子、新井良八、 木村博、柏木厚典、安田斎	脊髄後根神経節ニューロンを標的とするファージ・システムの開発	
学会等名	発表年月日	学会等名
厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、「難治性ニューロパチーの病態に基づく新規治療法の開発」班、分担研究者発表会 平成19年度班会議	平成19年12月5日	東京

(3) 図書（著者名、出版社名、書名等）

〔図書〕計（2）件

著者名	出版社	
小島秀人、藤宮峯子、柏木厚典、 木村博	診断と治療社	
書名	発行年	総ページ数
糖尿病学の進歩2007	2007	6

著者名	出版社	
小島秀人、寺島智也、藤宮峯子、 柏木厚典、木村博	診断と治療社	
書名	発行年	総ページ数
糖尿病学2007	2007	7

研究成果による産業財産権の出願・取得状況  
なし

## 研究成果

### はじめに

食の豊かさ、生活の便利さを求めて人類は限りなく歩み続けてきた。特にここ百年の間の食料生産の拡大や機器の発達には目をみはるものがある。その結果、皮肉なことに今や人類はかつて経験したことのないエネルギー摂取過多と運動不足の局面に立たされている。今日では主として先進国において、膨大な数の人々が糖尿病に罹患し、このまま進むと、糖尿病は人類の繁栄さえも脅かしかねないと言われている。この問題に根本的な解決をめざし、糖尿病の発症の原因を探るべく世界中で多くの研究者が糖尿病関連遺伝子の研究に携わってきた。その結果、糖尿病は複合遺伝子疾患であり、糖尿病ならびに合併症は細胞内シグナル伝達系の異常によって引き起こされることが明らかにされてきている。しかし、この様な華々しい成果にもかかわらず、残念ながら、現在のところ「糖尿病と合併症はいったん発症すると治癒する可能性はほとんどない」というやっかいな問題を解決するための糸口は見つかっていない。この難題を解決するために、ゲノム解析などを通して得られた情報を次のステップへと進め、糖尿病治癒という本体に迫る必要がある。多くの遺伝子が糖尿病発症に関わっているが、個々の発症に必ずすべての遺伝子が関与しているというわけではない。つまり、発症ごとに関与する遺伝子群が異なるのである。しかしながら、糖尿病特有の不可逆的な経過はすべての患者に共通して出現することから、この原因を解決してゆくなかに、糖尿病の予防と治癒をめざすための具体的な対策のヒントが潜んでいるかもしれない。

本研究では、骨髄由来の異常細胞に焦点を当て、その細胞が肝臓と神経においてどのようにして糖尿病特有の病態を生み出すのか、また、骨髄に生じた異常細胞の正体は何なのか、さらに、それらを通して、どうして糖尿病は不可逆性の転帰をたどるのかを追跡した。以下に、本研究を開始するに至った経緯と本研究により得られた成果を示し、今後の課題についてまとめる。なお、本研究に関係して報告した論文はこのまとめの中で引用し、それを添付する。

### 予期せぬ発見

我々は、インスリン分泌不全を伴うストレプトゾトシン糖尿病モデルマウス (STZ マウス)において、肝臓内に新たな膵島を新生させ、糖尿病を治癒させるための遺伝子治療法の開発に成功した (論文1, 論文2)。この方法は膵島発生に重要な役割を持つ転写因子を用いて、成熟個体の肝臓内で、臓器本来の発生の方向を変更させ、膵島形成へと向かわせるというものであった (論文3)。しかし、その研究過程でこれまで経験したことがない奇妙な事実遭遇した。それはインスリン分泌不全を伴う糖尿病マウスの肝臓内に、遺伝子治療目的の転写因子群を発現させる前に、すでにインスリン遺伝子が発現していることを発見したのである (論文4)。もちろん、非糖尿病状態ではこのような現象は全く見られなかった。従って、この現象は、糖尿病になった個体が、肝臓内にインスリンを発現させ膵臓からのインスリン不足による代謝不全状態を改善しようとする一過性の生体反応とも考えられた。しかし、免疫染色により調べたところ、発現しているインスリンはインスリンとしての作用をほとんど持たないプロインスリンであり、その発現量も極めて僅かであった。しかも、罹病期間とともにその発現が増加していたにもかかわらず、糖尿病マウスの血糖改善には何の役にも立っていなかった。そこで我々は以下の疑問を持つに至った。

疑問1 : いったい何のためにプロインスリンは発現してきたのであろうか?

疑問2 : 肝臓以外の臓器はどうだろうか?

疑問3 : どのような機序が働いたのであろうか?

疑問4 : 長い歴史を持つインスリン研究のなかでどうして今まで発見されずにきたのであろうか?

たしかに、肝臓内に膵島を作り出すという特殊な研究目的を持たなければ、けっして肝臓内のインスリンを探索することは行わないし、また、常識的にそのような研究は意味をなさない。しかし、研究を進めるにつれ、我々はインスリン研究の歴史の中で埋没してきた驚くべき出来事を知ることになり、やがて、分化成熟した細胞における遺伝子発現の常識とされてきた大前提が崩れて行く様を経験した (論文5)。

## 膵外プロインスリン産生細胞

まず、疑問2を解決するために、STZ 糖尿病発症マウスの肝臓以外の臓器においても、プロインスリン染色を行い、非糖尿病マウスと比較した。非糖尿病

マウスではプロインスリンの発現は両者ともに胸腺と膵臓に限られていたが、STZ マウスでは、それらの臓器に加え、肝臓はもとより、脂肪組織、骨髄、脾臓でも明らかに発現が認められた。一方、RT-PCR 法を用いて、インスリン遺伝子の発現を検討した。齧歯類はヒトと異なりインスリン-I とインスリン-II の二つのインスリン遺伝子を持つ。PCR を 40 サイクル行ったところ、非糖尿病マウスでは免疫染色と同じように、膵臓、胸腺、一部に脾臓で両インスリン遺伝子が発現していたが、その他の臓器ではほとんど発現が確認できなかった。しかし、STZ 糖尿病マウスでは、少なくともプロインスリンが染色された臓器においてインスリン遺伝子の発現が認められたのである。これにより、肝臓以外の臓器でも、本来インスリンの発現など考えられない臓器でインスリン遺伝子が発現していることが明らかになった。ここで、もう一つの新たな疑問が生まれた。

疑問5：では、ほかの糖尿病モデル動物ではどうであろうか？

そこで、STZ ラット、レプチン欠損の遺伝的変異により糖尿病が誘導される ob/ob マウス、ならび食事性に糖尿病が誘導される高脂肪食負荷マウスを用いて検討したが、3者ともに免疫染色、遺伝子発現ともに STZ とほぼ同様の結果が得られた。これにより、疑問5については STZ マウスに限らず、他の糖尿病モデル動物でも様々な臓器でプロインスリンが発現していることが明らかとなった。従って、プロインスリンの発現は糖尿病の病型に関わらず、高血糖そのものにより誘導された可能性が高いと考えられたことから、一日4回2時間ごとに腹腔内にブドウ糖を負荷して 300mg/dl 以上の高血糖状態を断続的に作成したマウスにおいて観察したところ、ブドウ糖負荷開始後すでに3日目に、肝臓、脂肪組織、脾臓、骨髄においてプロインスリンの発現が観察された。この様に、疑問3についても解答がほぼ明らかとなってきた。

## 歴史に消えた膵外インスリン産生

すでに1970年代から膵外インスリン分泌の有無についての議論がなされていた。NIH の研究グループは齧歯類を用いた研究で、開発されたばかりの免疫測定法を用いて、脳内でのインスリン濃度が血液中より高いことから、脳がインスリンを産生している可能性を報告していたのである。しかし、これに対して、インスリンの免疫測定法を Berson とともに開発しノーベル賞に輝いたば

かりの Yalow は、膵臓以外の臓器はけっしてインスリンを産生していないと NIH の研究グループの報告に異議を唱え、その後何年にもわたって両グループは壮絶な議論を戦わせていたのである。実は両者とも、全く同じ方法を用いてインスリン濃度を測定していたのであるが、残念ながら、組織からのインスリン抽出法の違いにより、全く異なる結論が導かれたのであった。さらに、Yalow が非糖尿病動物を用いたのに対し、NIH のグループは糖尿病での異常の有無を考えてのことかどうか不明ではあるが、我々と同じように STZ 糖尿病モデル、さらには ob/ob マウスを用いていたのである。しかし、当時は分子生物学的手法が確立されておらず、また、遺伝子解析の技術的限界もあり、彼らの苦労は想像に余りあるものだったと思われる。実際、Yalow が論文の最後に述べているように、臓器内でのインスリン mRNA の発現を明らかにしない限りこの議論は決着しないものであったが、当時の技術では不可能であったと推察される。膵外インスリンの有無ならびにその生理学的な意義については、年月を経るつれ研究対象としての興味が失われ、結論が曖昧なまま忘れ去られていった。しかし、膵臓以外にインスリンは発現していないという Yalow らの意に反して、20 年近くたった 1994 年になって脳におけるインスリン mRNA の発現が明らかにされた (論文 4)。現在、脳におけるインスリン研究は、その産生細胞の特定と同時に、新しく発見されたインスリン様活性ペプチドの生理学的な意義について精力的な研究が行われている。しかし、糖尿病との関連についてはほとんど検討されていない。四半世紀も前に行われた先駆的な研究は、技術的な未発達、他分野からの情報不足、その他様々な要因で埋もれてしまったのだと思われる。以上、疑問 4 が解けた。

一方、これとは別に、胸腺におけるインスリン発現の意義については、1 型糖尿病との関連で大変重要な研究が多くなされている。特に、1 型糖尿病では自己抗原を提示する細胞がリンパ球の negative selection を行う際の異常が明らかとなっており、自己免疫疾患の責任臓器の一つとしての胸腺の役割、ならびにインスリンの発現についての重要な発見が報告されている。

以上、少なくとも、インスリンを産生する細胞が膵臓ならびに胸腺以外に脳で発現していることは明らかである。今回、我々は糖尿病動物において、種々の臓器内にインスリン遺伝子の発現を認めた。本来発現するはずのない臓器にインスリン遺伝子が発現している点について、二つの可能性が考えられた。第一は各臓器細胞が高血糖刺激でインスリン遺伝子を直接発現する可能性である。

第二は、とても起こりそうに思われなかったのであるが、インスリン遺伝子が臓器の外から持ち込まれた可能性である。過去の文献の中にはこれを示す証拠は全く報告されていないのである。そこで我々はプロインスリン産生細胞が骨髄で出現していることに着目し、大胆な仮説を立ててみた。すなわち、骨髄に出現したインスリン遺伝子を発現する細胞が他の臓器内へと遊走し、そこで本来発現するはずのないインスリンを発現しているとすれば、膵以外の様々な臓器内にプロインスリンが観察されるという奇異な状況を説明できると考えたのである。つまり、プロインスリンを産生する細胞は骨髄由来かもしれないと。

## プロインスリン産生細胞の怪

糖尿病マウスの肝臓に出現しているプロインスリン産生細胞について、他の膵ホルモンの発現を免疫組織学的に検討した。驚いたことに、グルカゴン、ソマトスタチン、pancreatic polypeptide のすべてが陽性となった。従って、この細胞は膵内分泌形質を持つ細胞である。また、この細胞は大きさが異常に大きい細胞から小さい細胞まで様々であり、形態学的には明らかに肝実質細胞と思われる細胞が多く含まれていた。一方、前述のように骨髄由来の細胞である可能性を検討するために、その指標である CD45 をプロインスリンと同時に二重染色したところ、予想通り、プロインスリン陽性の細胞が CD45 で標識された。ただし、血液細胞では CD45 は細胞膜に染色されるのであるが、肝臓では細胞質にも強く染色された。次に、プロインスリンを産生する細胞が本当に骨髄由来であるかを検討するために、マウス・インスリンプロモータの制御下に GFP 遺伝子を発現する MIP-GFP マウスから骨髄を取り出し、これを正常マウスに骨髄移植した後、さらに STZ にて糖尿病を作成し、肝臓での GFP の発現を検討した。骨髄、肝臓ともに GFP 遺伝子の発現を認め、プロインスリンを発現する細胞は移植した骨髄由来であることが明らかとなった（論文6）。

以上、糖尿病個体では骨髄に不完全な膵内分泌形質を有する細胞が出現し、これが肝臓や脂肪組織、脾臓などへ遊走していたのである。しかも、細胞内で発現しているインスリンは作用を持たない未熟なプロインスリンが主体であり、本来膜分面に発現するはずの CD45 が細胞質に発現している。さらに、これらの細胞は肝臓や脂肪組織では遊走した先の臓器細胞へと形態学的な変化が生じているのである。どう考えても、これらの細胞は明らかに異常であり、糖尿病

の改善に寄与しているとは思えなかった。

## 分化か細胞融合か？

研究は目的を明確にしておかなければけっして結論を得ることはできない。我々が見出した現象は、少なくともこれまでどこにも記載されていない現象である。したがって、それが糖尿病の病態に良い影響を及ぼすものか、それとも悪化させるものなのか確実に見定めておかななくてはならない。すなわち、疑問1で述べたように、インスリン発現の意義と同時に細胞の存在意義を、仮説を立てて明らかにすることが必要であった。当時、「骨髄にある幹細胞形質を持った未分化細胞が、体内のいろいろな臓器へ遊走し、そこで、傷害を受けた細胞に代わって臓器細胞へと分化誘導され、臓器の機能を再生する」という報告を受け、骨髄にある未分化細胞には大変な関心が向けられ始めていた。しかし、我々が見出した細胞はけっして臓器の再生を促進しているようには思えなかった。というのはモデル動物に出現した糖尿病状態や合併症は、悪くなるいっぽうで、けっして良くはならないからである。

よって、この細胞は糖尿病特有の合併症に関与するものではないかとの仮説を立てて、そのことを最も確実に証明できる方法として、糖尿病性末梢神経障害に着目した。神経組織では肝臓や脂肪組織と異なり、傷害を受けた神経細胞が分裂し再生することはほとんどないと考えられる。したがって、骨髄由来であるこの細胞がもし出現しているとすれば、その特徴をつかみ、役割を考察する上、糖尿病性末梢神経障害は大変好都合であった。そこで、前述のように MIP-GFP マウスの骨髄を骨髄移植した後、STZ 投与により作成した糖尿病マウスにおいて、脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) における GFP の発現を観察した。予想通り、GFP を産生する細胞が出現しており、しかも、その細胞は形態学的には明らかに神経細胞の形をしていた。しかも、骨髄由来であることを示す CD45 が細胞膜と細胞質の両方に染色されるという異常な性質を持っていた。また、インスリン mRNA の *in situ hybridization* により、*insulin-1* と *insulin-2* の両者の発現が観察された。さらに、神経細胞の軸索が存在する座骨神経内においてもプロインスリン、CD45、ならびに GFP の発現が斑状に観察された。また、これらは神経細胞の特異指標であるニューロフィラメント、あるいはシュワン細胞の指標である S-100 タンパク質と同時に染色されたので

ある。以上の結果から、骨髄細胞は自ら神経細胞ならびにシュワン細胞へと分化したのではなく、むしろ、もとあった神経細胞やシュワン細胞と細胞融合したのではないかと考えられた。

そこで、骨髄移植を行うレシピエントを正常マウスからベータガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) をトランスジェニックしたマウスへと変更し、そのマウスに MIP-GFP マウスの骨髄を移植し、糖尿病の有無による違いを観察した。STZ により糖尿病を発症したマウスでは  $\beta$ -gal と GFP を同時に発現する異常な神経細胞やシュワン細胞が観察されたが、非糖尿病マウスではそのような所見は全く見られなかったことより、末梢神経に出現するプロインスリン産生細胞は骨髄由来のプロインスリン産生細胞が末梢神経に元々あった細胞と細胞融合したものであると結論づけることができた。この点については肝臓においても、同様なことが観察された (論文6)。

## 神経細胞への自爆テロリズム

この細胞融合が神経機能に対して有効に働いているのかそれとも傷害しているのかを明らかにする目的から、骨髄由来のプロインスリン産生細胞と神経細胞との細胞融合によりもたらされる神経の機能変化について検討した。糖尿病マウスの罹病期間と神経機能の変化ならびにプロインスリン産生細胞の出現頻度を観察したところ、罹病期間の進行に従って神経伝導速度の低下が強くなり、それに一致してプロインスリン産生細胞の数が増加していた。糖尿病では tumor necrotizing factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) の発現が増加し、それが合併症の発現と進行に重要な役割を持っていると報告されている。そこで、TNF $\alpha$  の発現を観察したところ、骨髄内においてすでにプロインスリン産生細胞は TNF $\alpha$  を発現しており、神経細胞ならびにシュワン細胞においても、その発現が観察された。従って、細胞融合によって、プロインスリン遺伝子のみならず細胞の機能障害を誘導する TNF $\alpha$  遺伝子までもが神経細胞内へと輸送され、発現している可能性が高い。

次に、DRG の神経細胞を分離培養して、糖尿病による機能的変化を観察した。分離培養した細胞の DNA 含有量(DNA ploidy)を測定したところ、正常動物の DRG では、2n の細胞が全体の 99%を占めていたのに対し、それ以外はすべて 4n であった。一方、糖尿病罹病期間が 1 2 週間の糖尿病動物では 2n の細胞は

87%しかなく、4nが増加しているのみならず、6n、8nの細胞までも出現していた。一方、糖尿病でのみ出現するプロインスリン陽性細胞だけを集めてDNA ploidyを測定すると、実に4n以上を示す細胞が全プロインスリン陽性細胞の93%を占めていた。このことは、プロインスリンを産生する神経細胞は、そのほとんどが細胞融合したものであることを示すものである。さらに、プロインスリン産生神経細胞は細胞内カルシウム代謝に明らかな異常をきたしており、神経機能に重大な障害を有していることが明らかとなった。また、プロインスリン産生細胞は長期培養による生存率が低下しており、カスパーゼ-3の発現増加、アネキシンV陽性細胞の増加、ならびにTUNEL陽性細胞が増加していたことから、アポトーシスが誘導されている細胞が増加していることも明らかとなった。これらの現象が高血糖により誘導されたものであることを確認するために、STZ投与後、3日目より皮下インスリンポンプを使用して血糖を正常化させ、予防実験を行ったところ、神経細胞に生じたほとんどすべての異常は出現せず、また神経伝導速度の異常も見られなかった。

以上のことから、持続性の高血糖により骨髄内に異常な遺伝子発現プログラムを持つ細胞が生まれ、この細胞が骨髄から末梢神経へと遊走し、そこで神経細胞やシュワン細胞と細胞融合する。この融合により、骨髄細胞内で異常な発現をしている遺伝子は融合した先の神経細胞内でも発現することになり、細胞に不可逆性の機能障害が生じ、やがて、進行性の末梢神経障害へとつながると考えられた（論文4）。現代風の表現を使うと、この不条理の細胞融合プログラムは、まさに、いつ終わるともなく繰り返される「自爆テロリズム」といっても過言ではない。

## テロリスト細胞とその正体

末梢神経組織における研究結果から、肝臓におけるプロインスリン産生細胞も、同様の機序で骨髄由来の異常細胞が肝臓内の細胞と細胞融合している可能性が考えられた。そこで、神経と同様の検討を行ったところ、やはり骨髄由来のプロインスリン産生細胞が肝細胞と細胞融合し、しかも、TNF $\alpha$ を産生していることが明らかとなった（論文6）。

糖尿病状態で骨髄に出現したプロインスリン産生細胞はどのような機序で誘導され、どのような異常を持った細胞なのであろうか？これまでの研究から、

プロインスリンの発現は直接には神経障害に関与するものではないと思われる。しかし、TNF $\alpha$ の発現は明らかに融合した相手細胞の機能、ならびにその細胞に隣接する多くの細胞を傷害している可能性がある。しかし、いずれの遺伝子も、本来、末梢神経細胞や肝細胞の中で直接発現する遺伝子でなく、明らかに不適切な遺伝子である。骨髄の特異な細胞群ではTNF $\alpha$ に限らず、他の遺伝子も発現している可能性が高く、細胞融合という形で様々な臓器細胞内へと輸送され、そこで不条理な遺伝子発現状態を作り出していることも容易に推察される。しかも、細胞融合により持ち込まれた遺伝子レベルでの形質変異は、おそらくは簡単にはもとどおりに回復することはなく、細胞内で様々な混乱を生じさせていると思われる。よって、糖尿病により作り出される異常な骨髄由来の細胞こそが、多くの合併症に共通する不可逆性の性質を作り出している本体ではないかと考えられるのである。

そこで、骨髄の分析に取りかかった。骨髄細胞をその分化度の違いにより分類したところ糖尿病では分化してもうそれ以上増殖できない細胞のみならず、増殖能を持つ未分化な分画の細胞内にすでにインスリン遺伝子並びにTNF $\alpha$ 遺伝子の発現が見られたのである（未発表）。すなわち、幹細胞形質を持つ細胞内に、糖尿病に伴う異常な形質がすでに発現しており、この細胞はあたかも白血病幹細胞のごとく、治療抵抗性と病態の多様性を作り出しているのではないかと考えられる。現在、マイクロアレーによるこの詳細な遺伝子発現の分析を行っている。

## 異常細胞の除去と新規治療法の提示

次に、糖尿病で出現する異常な細胞に治療を加えることにより、糖尿病並びに合併症からの脱却が可能であるか否かを検討するために、新たな遺伝子治療ベクターの作製を開始した。Phage Display Peptide Libraryを用いたin vitro バイオパンニングにより、87種類のDRGニューロンに親和性を有するペプチド配列を抽出した。この配列のうち3種類を用いて、DRGニューロンに対する特異性をin vitro ならびにin vivo で検討し、有用性を明らかにした（論文7）。次に、ファージベクターの作製を行い、緑色蛍光色素(GFP)を発現する遺伝子配列をこれらのベクターに組み込み、in vivo にて、遺伝子発現の効率を観察している(現在継続中)。今後、EPO、NGFならびにTNF $\alpha$ のRNAiを用いて、発現

システムを作り上げる予定である。ベクター作製の完成までには今しばらくの努力が必要であるが、これらの結果は異常骨髄細胞ならびに病的神経細胞を標的とする遺伝子治療を計画することが可能であることを意味しており、現在開発を進めている。

また、白血病治療薬 *imatinib* を用いて、骨髄の異常細胞並びに合併症に対する治療効果についても、引き続き検討中である。一部、興味ある結果が得られているが、公表については研究が完了しだい行いたい。

## おわりに

糖尿病では、合併症臓器における様々な遺伝子の発現異常が明らかになっている。今回我々が報告した細胞融合機序は、これまで観察されてきたそれらの異常を矛盾なく説明できるものでなくてはならない。さらに、異常細胞が骨髄のどのような細胞集団から出現してくるのか、その正体を明らかにしなくてはならない。これらは今後の研究における最も重要な課題と考えている。