

## 糖尿病合併症を誘導する異常骨髄幹細胞の同定と新規治療の開発

小島 秀人<sup>1)</sup>, 檜 美和子<sup>1)</sup>, 寺島 智也<sup>2)</sup>, 前川 聡<sup>2)</sup>, 木村 博<sup>1)</sup>

1) 生化学・分子生物学講座

2) 内科学講座

### Erase the evil within the stem cells in diabetes mellitus

Hideto KOJIMA<sup>1)</sup>, Miwako KATAGI<sup>1)</sup>, Tomoya TERAHIMA<sup>2)</sup>,

Hiroshi MAEGAWA<sup>2)</sup> and Hiroshi KIMURA<sup>1)</sup>

1) Department of Biochemistry and Molecular Biology

2) Department of Medicine

#### Abstract

Diabetes therapy has dramatically progressed, but the chronic complications such as microvascular and macrovascular complications are still the important causes of morbidity and mortality rates in diabetic patients. Metabolic perturbations such as oxidative stress, advance glycation end product formation, protein kinase C and NF $\kappa$ B activation, increased polyol flux, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activation play key roles in the onset of the chronic complications. However, the direct cause is not discovered. Thus, the treatments for the purpose to cure the complications are not established. Recently, we found bone marrow-derived cells that have abnormal characteristics in their stem cell phase, and were related to the onset of the diabetic complications. Here we show some evidences that the abnormal bone marrow-derived cells were formed under the high-glucose toxic condition in the bone marrow stem cells, which was produced by diabetic hyperglycemia, and played a major role as an important pathogenesis of the chronic complications in diabetes mellitus. Based on those results, we will describe some strategies that lead to the development of new treatments against their evil characteristics of the diabetic bone marrow stem cells.

**Keyword** chronic diabetic complications, bone marrow, neuropathy, osteoporosis, proinsulin

#### 1. はじめに

糖尿病は放置すれば死に至る重篤な合併症を併発する。合併症には糖尿病性昏睡のように急性の代謝障害で生じる急性合併症と、大小血管障害や骨粗鬆症な

どのように長期間の高血糖状態が持続することにより出現する慢性合併症に分けられる。近年では新しいインスリン製剤ならびにインスリン治療用デバイスの発達がめざましく、さらに、患者さんへの教育法の進歩もあり、急性合併症のために死に至る例は激減した。しかし、慢性合併症は減るどころか、逆に増加してい

---

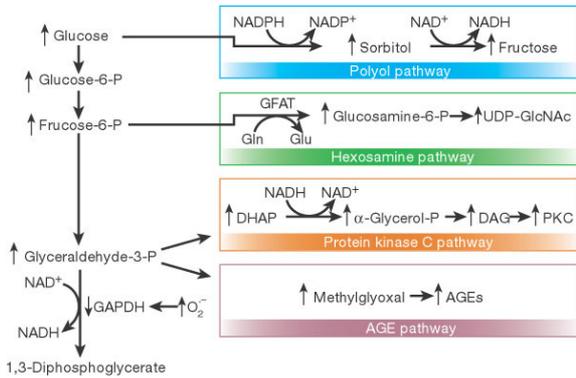
Received January 9, 2013 Accepted: February 20, 2013

Correspondence: 滋賀医科大学生化学・分子生物学講座 小島 秀人

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 kojima@belle.shiga-med.ac.jp

る。この原因は、慢性合併症を引き起こす根本的な要因が同定されていないからと考えられる。

慢性合併症の原因としては、酸化ストレスの亢進、糖化最終産物の増加、C-キナーゼと NF $\kappa$ B の活性化、ポリオール経路の亢進、さらに、最近ではポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1) などが報告されてきた。確かにこれらの変化は高血糖状態に伴う代謝異常が原因として起こってくるものである(図 1) [1]。



(Nature 2001 より改変)

図 1. 高血糖状態に伴う代謝異常と合併症に関与するとされる様々な成因の関係

しかし、これらは糖代謝を是正すると元に戻る可能性が高い。したがって、これらの要因をもって、一旦発症すると進行性で治療困難な糖尿病合併症の病態をすべて説明するのは困難である。

## 2. プロインスリン産生細胞の発見

我々は、ストレプトゾトシン (STZ) によって作成した糖尿病マウスにおいて、遺伝子治療により肝臓内でインスリンを産生する膵島を新生させ、糖尿病を治療させる研究を行っていた。幸い、膵島発生に重要な転写因子である NeuroD1、ならびに膵島の増殖因子 betacellulin の遺伝子治療により、肝被膜下に半月状の膵島をたくさん作り出すことに成功し、マウスのインスリン欠乏型糖尿病は治療した[2]。しかし、驚いたことに、遺伝子治療を全くしていないコントロール糖尿病マウスの肝臓でもインスリンが染色されたのである。ただし、それはインスリンとしての活性をほとんど持たないプロインスリンであった(図 2) [2]。

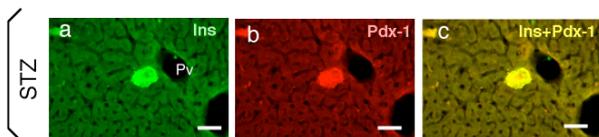


図 2. STZ マウス肝臓におけるプロインスリン産生細胞。インスリンの発現に関与する転写因子 Pdx-1 も同時に陽性を示す。

この現象は、これまで全く報告されていない不思議な現象であった[3]。そこで、STZ 糖尿病だけでなく、遺伝性肥満糖尿病モデルである ob/ob マウス (Ob/Ob)、高脂肪食負荷糖尿病マウス (HFD) などを用いて、様々な臓器でプロインスリンの発現を調べた[4]。その結果、このプロインスリン産生細胞は糖尿病マウスの肝臓だけでなく、脂肪組織や骨髄、脾臓でも出現していた。もちろんすでに報告があるとおり、胸腺では糖尿病、非糖尿病 (Nondiabetic) とともに発現していた (図 3)。

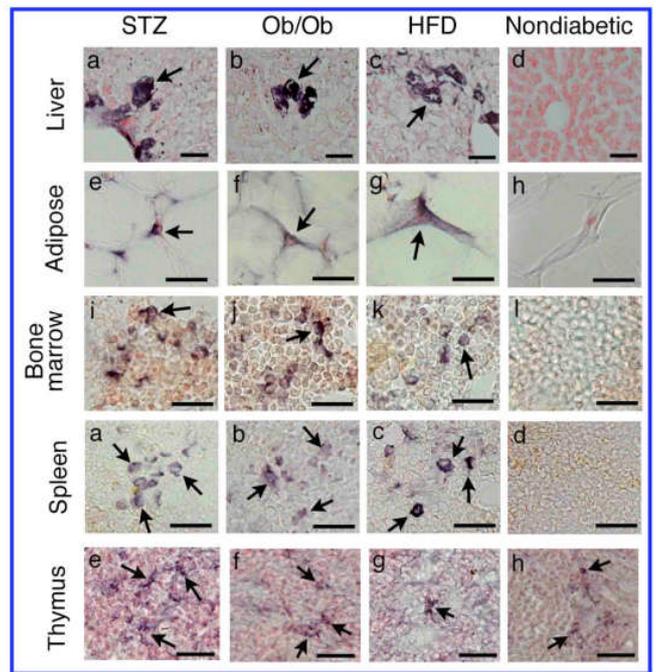


図 3. 糖尿病マウスにおけるプロインスリン陽性細胞の発現。

## 3. プロインスリン産生細胞の病的意義

糖尿病で出現するプロインスリン陽性細胞は決して糖尿病の高血糖を改善させる方向へと働くものではない。このことは、この細胞が出現したからといって血糖値が良くなるわけではないことから明らかである。

では、この細胞はどこから来て何をしようとしているのであろうか? 詳細な検討にて、プロインスリン陽性細胞が本来インスリンを発現するはずのない脂肪組織や肝臓からも出現していることが明らかとなった。そこで、この細胞は他の臓器から遊走してきた細胞である可能性を考え、その臓器とは骨髄由来ではないか

と仮説を立て検討した。放射線照射により、骨髄幹細胞を死滅させたマウスに緑色蛍光色素タンパク質 (GFP) トランスジェニック (TG) マウス骨髄移植を行った後、STZ 糖尿病を作成した。このマウスの臓器を調べたところ予想通り、肝臓、脂肪組織、胸腺、脾臓などに GFP 陽性細胞が染色され、骨髄由来の細胞であることが明らかとなった。しかし、この細胞は、肝臓では肝臓内にある肝細胞やクッパー細胞、さらに星細胞[4-5]、脂肪組織では脂肪細胞[4]というように、臓器本来の主たる細胞の形態をしていた。骨髄幹細胞が様々な臓器へ遊走し、そこでその臓器特異的な細胞へと分化する可能性については報告されている。しかし、ここではその数があまりに多い。さらに肝臓で見られた細胞はたいへん大きく、明らかに異常である。そこで、糖尿病の合併症に関連するような異常な形質を作り出すものではないかと考え、典型的な合併症臓器である末梢神経において骨髄由来の細胞の有無とその性質についての詳細を検討した。

#### 4. 異常な細胞融合現象の発見

非糖尿病マウスでは GFP マウスからの骨髄移植を行っても、傷害のない末梢神経組織(脊髄後根神経節、DRG)では骨髄由来を示す GFP 陽性細胞はほとんど見られない。しかし、糖尿病マウスでは GFP 陽性で、形態学的にも明らかに神経の形態をした細胞がたくさん認められた。骨髄由来の細胞が神経へと遊走し、そこで神経細胞へとどんどん分化しているとは考えにくい。

そこで、細胞融合を証明するために骨髄移植を行う際のレシピエントとして  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal)・トランスジェニックマウス (ROSA マウス)、ドナーとして GFP マウスからの骨髄移植を行い、そのマウスを STZ にて糖尿病として観察した。また、神経細胞の証明は神経特異的なマーカーであるニューロフィラメント (NF) を用いた (図 4)。共焦点顕微鏡での蛍光観察にて、GFP を緑、 $\beta$ -gal を赤、NF を青で示している。光の三原色である緑、赤、青が重なるものは白となり、その細胞が神経細胞で、骨髄から遊走してきた細胞と融合したものであることを示す[6]。

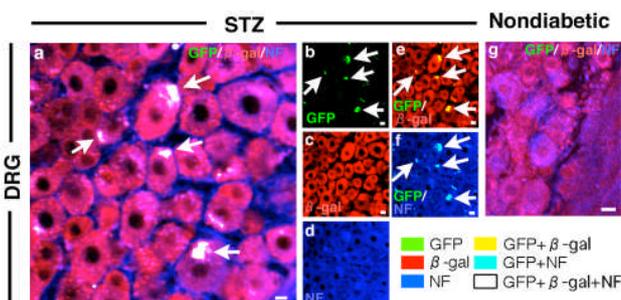


図 4. DRG における神経細胞と骨髄由来細胞の細胞融合。融合細胞を白↓で示す。

図から明らかなように、非糖尿病では白く染色される細胞は全く見られないが、糖尿病では 5-10%の細胞が白く染色されている。

次にこの細胞融合の特徴を検討したところ、以下のような現象が認められた。

- (1) 融合細胞の数は糖尿病罹病期間が長くなるほど増加した。
- (2) 融合細胞ではプロインスリンの発現が陽性であった。
- (3) 糖尿病マウスの DRG 神経細胞を単離しその機能を調べたところ、融合していない細胞では異常が認められなかったが、融合細胞では KCl 刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  代謝の異常を認めた。
- (4) 融合細胞からは  $TNF\alpha$  の発現が見られた。
- (5) 融合細胞の発現数と神経伝導速度の低下は罹病期間に比例して変化した。

これらのことから、骨髄細胞との細胞融合により神経細胞に持ち込まれる情報は正常な神経機能を阻害する可能性が示された。

#### 5. 合併症の誘導機序

以上の検討から少なくとも、糖尿病においては、肝臓[5]と神経[6]では骨髄由来でプロインスリンを産生する細胞が臓器固有の細胞と細胞融合しそこで  $TNF\alpha$  を発現し、臓器の機能異常 (脂肪肝や神経障害など) をもたらす可能性が示された。我々はこの他にも脂肪組織において同じようにプロインスリン産生細胞が発現していることを見出している[2]。従って、このような骨髄細胞由来の  $TNF\alpha$  の発現は、インスリン抵抗性の主たる原因となっていることが十分に想定される。

では、この骨髄由来の細胞は他の臓器でも同じように遊走して合併症に関与する異常を作り出しているであろうか。

糖尿病患者では骨折した時には、その回復障害が出現することが知られている[7]。骨折の治癒に働く細胞としては骨芽細胞と破骨細胞が重要とされる。これらの細胞は近年では骨髄の間葉系幹細胞に由来するのではないかと仮説もある。もしそうなら、糖尿病では、骨髄由来の骨芽細胞や破骨細胞に異常があるのではないかと考えた。そこで、糖尿病でこれらの細胞がどのようなになっているのかを検討した[8]。

- (1) GFP マウスから骨髄移植をし、そのマウスを STZ にて糖尿病としたのち、大腿骨骨折を

誘導し、その回復過程を非糖尿病マウスと比較検討した。

- (2) 糖尿病、非糖尿病に関わらず、骨髄由来細胞に比率では破骨細胞の 70-80%、骨芽細胞の 20%が骨髄由来であった。
- (3) 糖尿病では骨芽細胞に明らかな機能変異は見られなかった。しかし、骨折からの治癒起点である仮骨の吸収が遅れ、それにもない治癒の遅延が見られた。このことは破骨細胞の機能低下を意味する。
- (4) そこで、破骨細胞を観察すると、本来細胞融合より細胞体の大きなものがたくさん出現するはずであるが、糖尿病では融合がほとんど起こらず、小さい細胞がほとんどであった。これにより仮骨の吸収が遅くなったものと考えられる。
- (5) この破骨細胞の融合障害の原因として、融合タンパク質の 1 つである DC-STAMP の発現が低下していた。
- (6) 一方、肝臓や神経で見られたプロインスリン陽性細胞の出現は全く認められなかった。

以上より、糖尿病では骨髄幹細胞に由来する破骨細胞の機能障害が生じており、その原因として本来融合すべき細胞が融合せず、十分な機能を発揮できていない可能性が示された。

次に、糖尿病では糖尿病性胃腸障害 (diabetic gastroenteropathy) の 1 つとして消化管の運動障害が知られている。その原因はもっぱら神経障害が主たるものとされてきた。しかし、近年、消化管運動のリズム制御に関わる細胞としてカハールの間質細胞 (interstitial cell of Cajal, ICC) が重要な役割を持つことが報告されている。ICC は自律神経からの刺激を受けペースメーカーとして働き、腸の運動を制御する。その際、 $Ca^{2+}$  のシグナルによるお互いに刺激を連結して伝えるネットワークを形成している。この腸管の ICC は特異的なマーカーとして c-KIT の染色が用いられている。実際、糖尿病患者では大腸における c-KIT 陽性細胞の数を調べて、ICC の数の減少が報告されている [9]。そこで、これまでの研究と同様に GFP マウスからの骨髄移植モデルを用いて、糖尿病において骨髄由来の細胞が腸管の ICC の発現異常に関与しているかどうかを検討し、以下のような結果を得た [10]。

- (1) 腸管の部位により多少の差はあるものの、糖尿病マウスでは骨髄由来と考えられる GFP 陽性細胞の出現率が低下していた。
- (2) GFP 陽性細胞は c-Kit が陽性のものでないものがあるが、糖尿病では c-Kit 陽性細胞の総和、ならびに GFP 陽性かつ c-Kit 陽性細胞が

減少していた。

- (3) c-Kit ノックアウトマウスでは腸管の動きが障害されることが報告されている。従って、糖尿病では骨髄からの c-Kit 陽性細胞の遊走が低下していることが腸管運動能低下に関与している可能性がある。
- (4) 骨と同様に、肝臓や神経で見られたプロインスリン陽性細胞は全く見られなかった。

上記より、糖尿病性胃腸障害の一部にも、骨髄由来 ICC の減少と機能の変化が関与している可能性が明らかとなった。

以上のことから、糖尿病合併症の発症に関与すると思われる骨髄由来細胞に起きている変化としては以下のようにまとめられる。

- (1) 本来持っていない (細胞融合して融合相手細胞内で  $TNF\alpha$  などの細胞傷害性のサイトカインを発現するなど) 機能が発現する。
- (2) 本来の機能が制限され、十分に発揮できない。
- (3) 骨髄から各臓器に遊走して働く細胞の数が減少する。

すべての合併症について検討したわけではないが、これまでの結果より類推すると、正常骨髄から特定の細胞が様々な臓器へと遊走しそこで重要な役割をしている。それらは独自に機能分化した重要な働きを持っている可能性がある。肝臓のクッパー細胞や星細胞、消化管の ICC、脂肪組織の脂肪細胞、骨組織の破骨細胞などがそれである。

一方、これらとは別に、糖尿病では糖尿病特異的に  $TNF\alpha$  を産生し、神経細胞や肝細胞と特異的に細胞融合する異常な細胞が出現している。さらに、これに呼応するかのようには、上記に述べた正常状態で常に出現し、様々な臓器内で役割を果たしている骨髄由来の細胞が機能を失ったり、数の減少を来したりしている。このことは高血糖下に骨髄内でこれらの細胞のもとになる細胞、すなわち骨髄幹細胞 (造血幹細胞と間葉系幹細胞を含む) に異常が生じていることを示唆する。

## 6. 合併症は治療できるのか？

ここで話を糖尿病性神経障害に戻す。神経障害では骨髄由来の異常な細胞が DRG 神経細胞に細胞融合し、そこに本来神経で発現するはずのない  $TNF\alpha$  の遺伝子を強制発現させ、融合細胞だけでなく、まわりの細胞にも  $TNF\alpha$  の悪影響を与えることになる。そのような、半ば外界から加えられた異常な遺伝子発現を元に戻し、神経の正常な機能の回復は可能であろうか？

この点について検討する目的から、すでに慢性関節リュウマチに対する新しい分子標的薬として開発され

ている抗 TNF $\alpha$  抗体薬 (infiximab) のマウス糖尿病性神経障害に対する治療効果を検討した[11]。

- (1) STZ 糖尿病マウスを作成し、すでに神経障害のために坐骨神経の神経伝導速度が低下したマウスに infiximab を投与して2週間の経過を観察した。
- (2) Infiximab は糖尿病マウスの神経障害を完全に治癒させた。
- (3) Infiximab は糖尿病マウスの神経組織で発現している細胞融合によりもたらされた異常な TNF $\alpha$  -mRNA の発現を消失させた (図 5)。

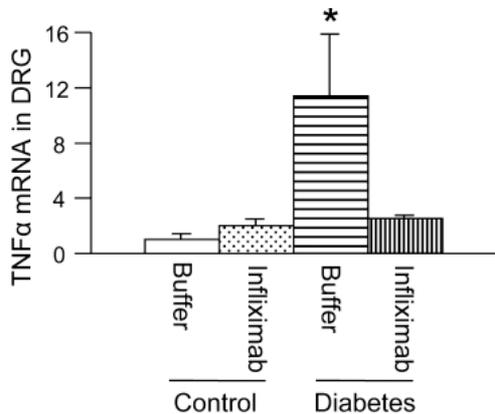


図 5. 糖尿病 DRG 神経細胞での TNF $\alpha$  -mRNA 発現に対する抗 TNF $\alpha$  抗体の作用

以上より、抗 TNF $\alpha$  抗体は神経組織中の TNF $\alpha$  タンパク質を低下させただけでなく、おそらく膜結合型 TNF $\alpha$  に接着し、細胞内の reverse signaling を介して DRG 内で発現している TNF $\alpha$  -mRNA の発現を抑制したことが想定される。また、poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) 阻害剤にても同様な効果が見られることを報告した[12]。

これらのことは、神経障害が実際に治癒可能な病態であることを明らかにしたものと考えられる。

## 7. 骨髄の異常への標的治療と今後の展望

糖尿病で起こる上記の異常を確実に捉えるためには、正常では出現せず、糖尿病で特異的に現れる細胞を抽出し、異常の正体を明らかにしなくてはならない。この場合、明らかな異常細胞はプロインスリンと TNF $\alpha$  を発現し、神経や幹細胞と細胞融合する能力を持つ細胞である。従って本来では出現するはずのない異常な分化を遂げた細胞が出現していることから、骨髄幹細胞内で、この異常を持つ細胞が無いかどうかを検討

することが重要と考えた。そうすれば、高血糖が正常細胞内に引き起こすより早期の障害を捉えることができ異常細胞の除去するための方法につながると考えた。

現在、骨髄幹細胞分画を採取し、上記で述べてきたプロインスリンや TNF $\alpha$  などの異常な遺伝子発現をマーカーとして解析を進めている。我々は、現在、標的とする細胞のみに遺伝子や薬物を輸送し、治療を行う全く新たな手法を開発しているところである[13]。これにより、実際に神経細胞などと細胞融合する異常細胞や、正常に分化することができない骨髄幹細胞を捉えることができれば、少なくとも一過性に糖尿病ならびに合併症を治癒へと導く治療法の開発も夢ではないと考える[14]。ただし、食事療法と運動療法を守ることができるという条件はいつの時代でも変わらず必須であると考えているのではあるが。

## 文献

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865):813-820, 2011.
- [2] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L. NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9(5):596-603, 2003.
- [3] Kojima H, Fujimiya M, Terashima T, Kimura H, Chan L. Extrapancratic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: is history repeating itself? *Endocr J* 53(6):715-722.
- [4] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2458-2463.
- [5] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10):4030-4035, 2007.
- [6] Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Oi J, Hara M, Kashiwagi A, Kimura H, Yasuda H, Chan L. The fusion of bone-marrow-derived proinsulin-expressing cells with nerve cells underlies diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35):12525-12530, 2005.
- [7] Inzerillo AM and Epstein S. Osteoporosis and diabetes mellitus. *Rev endocr Metab Disord* 5(3):261-268, 2004.
- [8] Kasahara T, Imai S, Kojima H, Katagi M, Kimura H, Chan L, Matsusue Y. Malfunction of bone marrow-derived osteoclasts and the delay of bone fracture healing in diabetic mice.
- [9] Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol*

Hepatology 17(6):666-670, 2002.

- [10] Li Y, Kojima H, Fujino K, Matsumura K, Katagi M, Urabe H, Chan L, Eguchi Y, Zhao L, Kimura H. Homing of the bone marrow-derived interstitial cells of Cajal is decreased in diabetic mouse intestine. *J Gastroenterol Hepatol* 26(6):1072-1078, 2011.
- [11] Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H. Inactivation of TNF- $\alpha$  ameliorates diabetic neuropathy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(5):E844-852, 2011.
- [12] Terashima T, Kojima H, Chan L. Bone marrow expression of poly(ADP-ribose) polymerase underlies diabetic neuropathy via hematopoietic-neuronal cell fusion. *FASEB J* 26(1): 295-308, 2012.
- [13] Terashima T, Oka K, Kritiz AB, Kojima H, Baker AH, Chan L. DRG-targeted helper-dependent adenoviruses mediate selective gene delivery for therapeutic rescue of sensory neuropathies in mice. *J Clin Invest* 119(7):2100-2112, 2009.
- [14] Chan L, Terashima T, Urabe H, Lin F, Kojima H. Pathogenesis of diabetic neuropathy: bad to the bone. *Ann N Y Acad Sci* 1240:70-76, 2011.