

マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF/CSF-1) 欠損マウス (*op/op*) を用いたマクロファージ分化機構の解析

新潟大学医学部病理学第二講座

内藤 眞・薄田 浩幸・梅津 哉・高塚 尚和

Macrophage Differentiation in Osteopetrotic Mice (*op/op*)
Defective in the Production of Macrophage Colony-
Stimulating Factor (M-CSF/CSF-1)

Makoto NAITO, Hiroyuki USUDA, Hajime UMEZU
and Hisakazu TAKATSUKA

*Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine*

Osteopetrotic (*op/op*) mouse is an animal model for osteopetrosis and was demonstrated to be a mutation within the coding region of M-CSF gene itself. The *op/op* mouse serves as a model for investigating the differentiation mechanism of macrophage populations in the absence of functional M-CSF. The *op/op* mice also provide evidence to show the role of M-CSF in physiological and pathological conditions.

The *op/op* mice are severely monocytopenic and show marked reduction and abnormal differentiation of tissue macrophages and osteoclasts. Most of these macrophages are ultrastructurally immature. Compared with the tissues of normal littermates, those of mutants contained about 30% of macrophages in many tissues, suggesting that the heterogeneity of macrophages is generated by their different dependency to M-CSF. In contrast, the numbers of dendritic cells in the epidermis and lymphoid apparatus of *op/op* mice were not reduced comparing to those in normal littermates, indicating that dendritic cells are an M-CSF-independent population. After daily M-CSF injection the numbers of monocytes, tissue macrophages, and osteoclasts showed remarkable increases and

Reprint request to: Makoto NAITO,
Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部病理学第2講座

内藤 眞

macrophages demonstrated morphological maturation. However, the numbers of macrophages in the ovary and uterus were not increased. After glucan injection hepatic granulomas in *op/op* mice were formed but smaller, less numerous, and more irregular in shape than those of normal littermates. Kupffer cells in the mutant mice exhibited an active proliferation capacity, particularly just before the stage of granuloma formation. After administration of M-CSF, numbers of monocytes and Kupffer cells increased rapidly in *op/op* mice and granuloma formation was enhanced in these mice. These results indicate that M-CSF-independent Kupffer cells and M-CSF-dependent macrophage populations play an important role in granuloma formation.

In conclusion, M-CSF is an important molecule for proliferation and differentiation of not only M-CSF-dependent macrophages but also M-CSF-independent macrophages in physiological conditions. Furthermore, M-CSF is largely responsible for providing a microenvironment for generating macrophage heterogeneity *in vivo*.

Key words: macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1), osteopetrotic mouse (*op/op*), macrophages, osteoclasts, dendritic cells, differentiation
マクロファージコロニー刺激因子, 大理石病マウス, マクロファージ, 破骨細胞, 樹状細胞, 分化

はじめに

マクロファージは骨髄の造血幹細胞に由来し, CFU-GM, CFU-M, 前単球, 単球へと分化して末梢血を循環した後, 組織でマクロファージへ分化成熟すると理解されている¹⁾。しかし, 生体内ではマクロファージの存在する組織や条件によって形態や機能に著しい差異が認められ, この様なマクロファージの多様性はマクロファージの分化機構の多様性を反映しているものと考えられる。マクロファージの分化, 増殖, 生存に直接的影響を及ぼす増殖因子として interleukin-3, 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF) およびマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor: M-CSF/CSF-1) の3つが知られている。その中で M-CSF はより選択的に, またより効率的にマクロファージの分化・増殖を調節すると考えられている。しかし, これらの増殖因子がマクロファージの分化機構のなかでどのような関係にあるかという問題は十分な検討がなされていない。 *in vitro* では各増殖因子に依存して分化増殖するマクロファージの検討がなされてきたが, 増殖因子とマクロファージの多様性との関係を *in vivo* で検討するためには, 増殖因子の過剰産生モデルや欠損モデルが重要であり, 近年増殖因子の transgenic mouse や knockout

mouse が作成されている。M-CSF を先天的に欠損している突然変異マウスの osteopetrotic (*op/op*) mouse はその意味できわめて有用な実験動物である。

われわれは M-CSF 欠損マウスのマクロファージとその類縁細胞の分化および M-CSF の生物学的, 病理学的役割について研究を行ってきた。本稿ではわれわれのこれまでの研究成績を中心にマクロファージの分化における M-CSF の役割について述べる。

op/op マウスの遺伝子異常

これまでヒト, ウサギ, ウシ, ラット, マウス, イヌなどに大理石病の発病が知られている。マウスでは gray lethal (*gl*), micro-ophthalmia (*mi*), osteosclerotic (*oc*), そして osteopetrotic (*op*) の4種類があり, いずれも常染色体劣性遺伝を示し, 破骨細胞の減少や機能低下が骨病変の原因と見なされている。これら突然変異マウスのうち *op/op* と *oc/oc* マウスは骨髄移植によっても骨病変の治癒, 改善がみられないことから, 造血支持環境に原因があるため, 造血幹細胞から破骨細胞への分化が障害されているものと推測された²⁾³⁾。1990年, 熊本大学の Yoshida らは *op/op* マウスの遺伝子を検索して挿入点突然変異を発見し, これが M-CSF 活性欠損をきたしていることを明らかにした⁴⁾。 *op* locus はマウスでは染色体の3番にある。M-CSF の cDNA の遺伝

<i>op/op</i>	Ala	Phe	Phe	Ser	Gly	Asn	Arg	His	Asn	Arg	*
(253)	GCC	TTT	TTT	TCT	GGT	ACA	AGA	CAT	AAT	AGA	TGA
				↑							
ST2	GCC	TTT	TTT	CTG	GTA	CAA	GAC	ATA	ATA	GAT	GAG
	Ala	Phe	Phe	Leu	Val	Gln	Asp	Ile	Ile	Asp	Glu

図 1 *op/op* マウスの M-CSF の cDNA 配列. 矢印の部にチミンの挿入があるため, 下流にストップコドン (*) が出現し, 蛋白合成は停止する. 下段は正常マウスから樹立した細胞株 (ST2) の M-CSF の cDNA 配列.

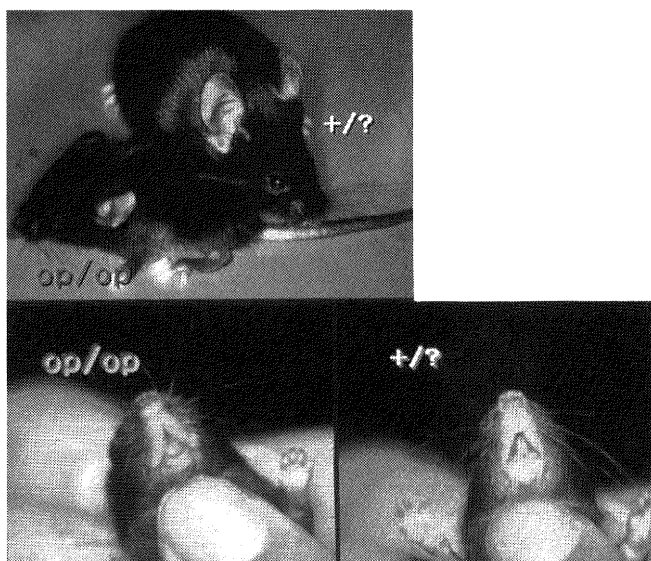


図 2 *op/op* マウスと正常同腹マウス (littermate: +/?).
op/op マウスは小さく, 切歯が生えない.

子塩基配列では 262 bp 下流にチミンの挿入があり, そのためフレームシフトが起こり, 21 bp 下流にストップコドンが出現し, M-CSF の機能発現部分の蛋白が産生されない (図 1). このため, M-CSF の mRNA は発現しているが, M-CSF の機能は全く発現されない⁴⁾⁵⁾. *op/op* マウスは CSF 欠損の証明された最初のモデルである.

op/op マウスの表現型と組織変化

op/op マウスは体格が小さく, 顔は丸く, 尾は短く, 切歯を欠損するなど外見的特徴がある (図 2). これらの表現型は生下時には判別できないが, 生後10日ごろに明らかになる. 破骨細胞の欠損によって骨の吸収, 改

築が障害され, 全身の骨硬化が顕著である⁶⁾. 皮質と髄質の明瞭な区別がなく, 骨質は海綿状で骨髓腔の形成が見られない (図 3). 骨変化は生後 2, 3 日から組織学的にも軟X線による検索でも観察できる. 通常破骨細胞は多核巨細胞の形態をとり, 骨質と接する面では ruffled border と呼ばれる多数の表面突起を有する. しかし, *op/op* マウスではこの破骨細胞は極めて少なく ruffled border の発達は不良である. 破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ反応 (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 陽性細胞もほとんど見あたらない.

op/op マウスでは歯の原器はあるがその発育は見られない. しかし, *op/op* マウスに M-CSF を投与する

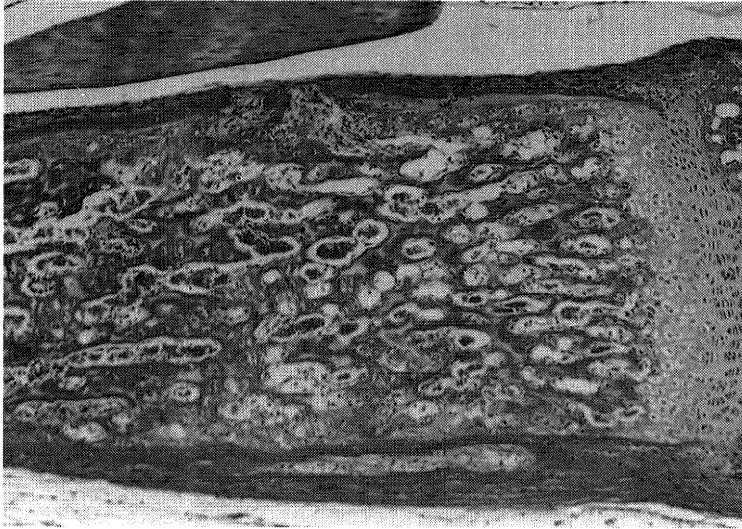


図3 *op/op* マウスの大腿骨. 海綿状骨梁が骨全体を埋めている.
H.E. ×40.

と2～3日後に破骨細胞が多数出現し, その結果骨病変が改善・治癒し, 歯も萌出する^{7)~9)}. これらの事実から破骨細胞の分化には M-CSF が必須であると考えられる. 骨髓腔の形成障害の結果, 造血スペースと造血細胞は著しく少ない. しかし, 極端な貧血はなく, *op/op* マウスでは脾臓の造血が活発であることから, 骨髓造血の不足を代償していると考えられる.

op/op マウスにおけるマクロファージの分化

op/op マウスでは血中の単球, 腹腔および胸腔マクロファージが少ない¹⁰⁾. 組織レベルでも種々の程度の減少が明らかにされ¹¹⁾¹²⁾, われわれの免疫組織学的検討では, *op/op* マウスの各組織のマクロファージは正常マウスに比較して肝臓の Kupffer 細胞は30%, 脾マクロファージは60%, 子宮のマクロファージは10%で, 卵巣, 滑膜, 大網などでは10%以下である¹¹⁾ (図4). 脾には種々のモノクローナル抗体で認識される特異なマクロファージ亜群が存在するが, そのなかで, MOMA-1で認識される marginal metallophilic macrophage と ER-TR9 で認識される marginal zone macrophage は *op/op* マウスには全く存在しない¹³⁾. これらの *op/op* マウスで欠損しているマクロファージは M-CSF 依存性マクロファージで, 一方存在しているマクロファージは M-CSF 非依存性マクロファージと考えられる. *op/op* マウスにおける GM-CSF 濃度はほぼ正常域にある

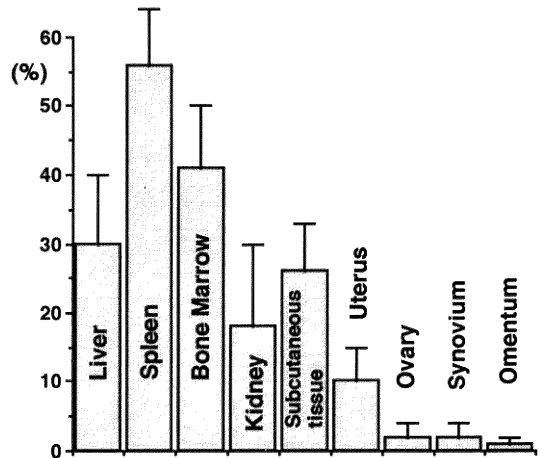


図4 正常同腹マウスのマクロファージ数を100%として算定した *op/op* マウスの各組織のマクロファージの比率. 子宮, 卵巣, 大網, 滑膜で特に少ない.

ことから, M-CSF 非依存性マクロファージの分化には GM-CSF が関与すると想定される.

電顕的には *op/op* マウスのマクロファージは一般に小型で, 細胞内小器官, ことにライソゾームや細胞表面突起の発達が悪く, Kupffer 細胞は在住マクロファージ型のペルオキシダーゼ反応は陰性である. しかしなが

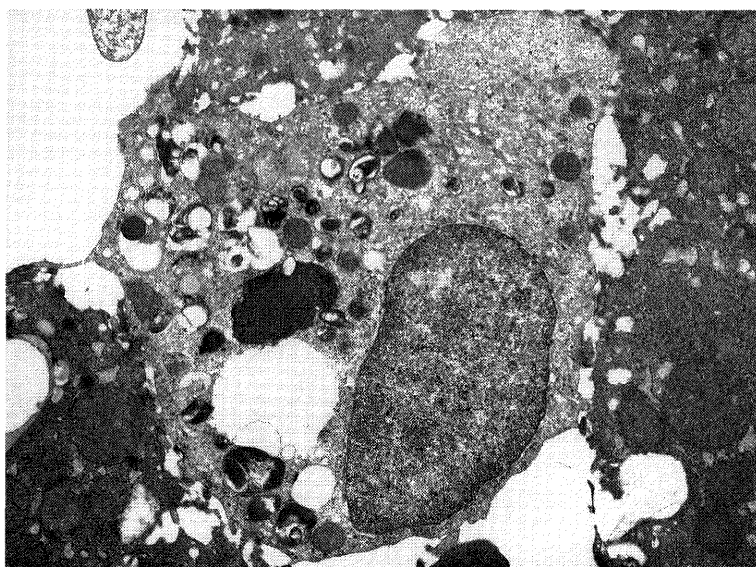


図 5 *op/op* マウスの Kupffer 細胞の電顕像. 小型で, 細胞内小器官の発達が悪いが, 食食は活発である. $\times 5,000$.

ら, 食食能は活発である (図 5). マクロファージの前駆細胞の検索では, 骨髄の CFU-GM は *op/op* マウスでは正常の約 1/9 と減少しているが, 脾臓の CFU-GM は 4 倍に増加している. しかし, 個体の体重当りに換算すると, *op/op* マウス骨髄内 CFU-GM は正常マウスの 1/3 と少ない. CFU-S についてみると, 骨髄では減少しているが, 脾臓では著変なく, 個体の体重当たりの CFU-S は約 1/6 に減少している¹⁴⁾. このような血液幹細胞やマクロファージ前駆細胞の減少は骨髄形成障害による二次的変化と解釈されるが, CFU-GM は CFU-S に比較して減少の程度は少なく, マクロファージ前駆細胞のプールは幹細胞のプールより M-CSF 活性欠如による影響が小さいことが示唆される.

マクロファージの分化を *in vitro* で観察するために *op/op* マウス肺から樹立された造血支持線維芽細胞株を用いて正常マウス骨髄細胞を培養すると, 2 週間後でも骨髄細胞は 95% 以上単球, 顆粒球の状態に留まり, 5% 程度の小型未熟マクロファージが分化した. このマクロファージは *op/op* マウスに観察される M-CSF 非依存性マクロファージに相当する¹¹⁾. この状態に M-CSF を添加すると, 培養細胞は成熟したマクロファージに分化した. このことから, M-CSF は主にマクロファージの分化の中間および最終段階に作用することが示唆される.

op/op マウスマクロファージの生後の変化

前述した様に, *op/op* マウスは生下時には同腹正常マウスと表現型の上では区別はできない. これはヘテロである母親の組織, ことに子宮内膜から多量に産生される M-CSF によって胎仔の発達は正常に進行するためと考えられる. しかし, 生後は急速に M-CSF 欠損状態に陥り, 10 日後には前述した外観の変化をきたす. それではマクロファージはどのように変化するのだろうか. 肝をはじめ多くの組織では生下時には正常マウスとほぼ同等のマクロファージが存在した. これら組織では予想通りマクロファージが徐々に減少し, 破骨細胞は急速に消失した. 一方, 滑膜や子宮では生下時からマクロファージが少なかった. Cecchini らも同様の事実を報告しており¹⁵⁾, 母体由来の M-CSF がなぜこれらマクロファージの分化を誘導しないのか不明である.

M-CSF 投与後の *op/op* マウスのマクロファージと破骨細胞

op/op マウスが M-CSF 欠損マウスであることが明らかにされたことから, *op/op* マウスに M-CSF を投与する実験が行われている. M-CSF を投与すると, 予想通り血中の単球, 骨における破骨細胞, さらに多くの組織でマクロファージの増加が観察された. 骨では M-

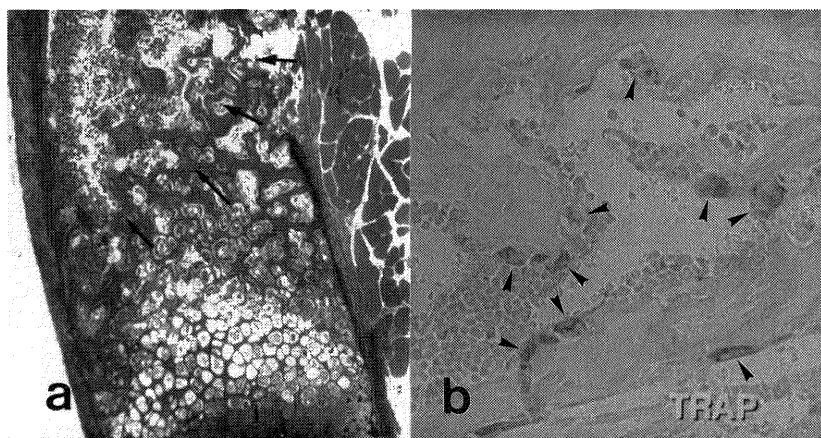


図 6 a) *op/op* マウスに M-CSF を連日投与すると3日後には破骨細胞が現れ、骨梁が融解され、骨髓腔(矢印)が形成されてくる。H.E. $\times 40$.
b) TRAP 染色陽性細胞(矢頭). $\times 200$.

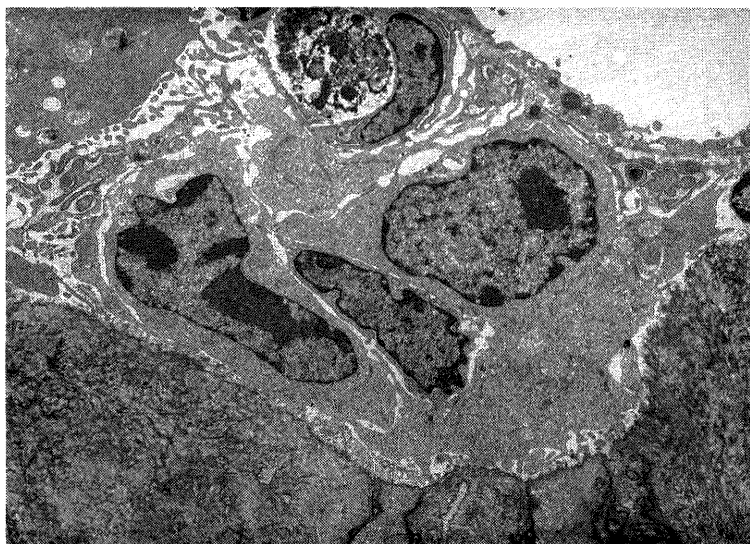


図 7 M-CSF 投与後出現する単核細胞。骨基質に接し、2～3個集合する像も見られる。 $\times 3,000$.

CSF 投与後2日に単核の TRAP 陽性細胞が急速に増加し、3日から多核の破骨細胞が出現した(図6)。TRAP 陽性単核、多核細胞は増殖能を持たないことから、前者は前破骨細胞であり、その融合によって破骨細胞が形成されるものと考えられた。電顕的に単核の細胞は多核細胞に変態する過程で細胞内空胞と骨に接する細胞膜に ruffled border を発達させる像が観察された(図7, 8)。それとともに骨梁が吸収され、骨髓腔が形成・拡大され

た。血液中の単球も前破骨細胞、破骨細胞と同じように M-CSF 投与2～3日後に急増するが、これでは単球から前破骨細胞、破骨細胞に分化すると考えるには時間的に説明がつかない。一方 M-CSF 投与直後から CFU-GM の増生が活発になることを考慮すると、破骨細胞は CFU-GM、ことに M-CSF に反応して増殖する分化段階の CFU-GM から分化するものと考えられる¹⁶⁾(図9)。

上記のマクロファージと異なり、腎、肺や子宮のマク

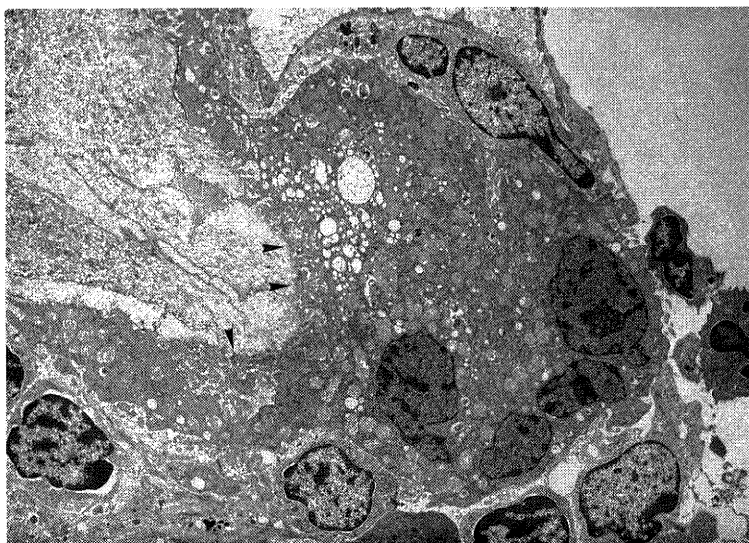


図 8 M-CSF 投与後 3 日以降，多核の破骨細胞が出現する。骨基質と接する面では ruffled border (矢頭) が発達している。×3,000.

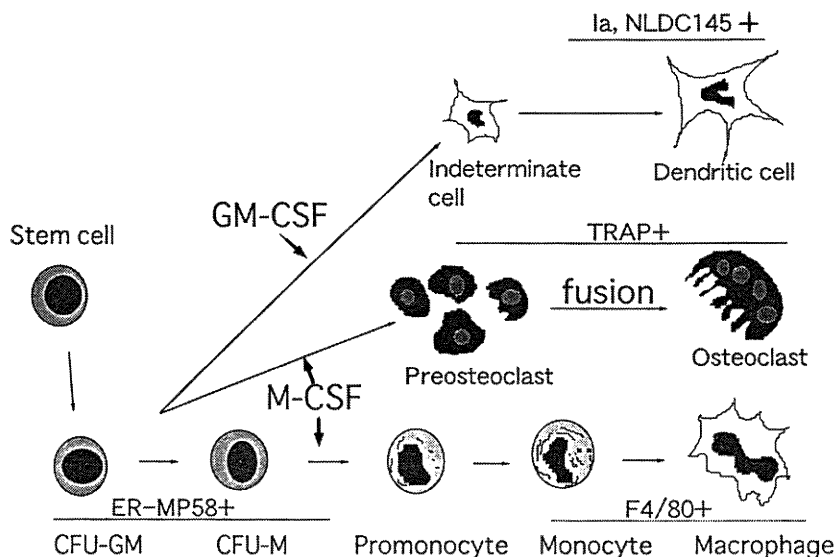


図 9 マクロファージ，破骨細胞，樹状細胞の分化模式図。単球系細胞，破骨細胞は M-CSF に依存した分化をする。樹状細胞は GM-CSF に依存し，M-CSF に依存しない。ER-MP58: CFU-GM, CFU-M を認識する抗体。TRAP: 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ。F4/80: マウスマクロファージの抗体。Ia: MHC class II 抗原。NLDC145: マウス樹状細胞の抗体。+: 陽性。

ロファージは M-CSF 投与によっても全く増加しない。また脾の濾胞周囲のマクロファージは回復が遅く、特に marginal zone macrophage は3カ月後でも完全には回復しない¹³⁾。肺のマクロファージの分化増殖は GM-CSF への依存度が高いことが知られており、確かに *op/op* マウスに M-CSF を投与しても数は増加しない。しかし、M-CSF 投与後形態的には明らかな成熟が認められ、肺マクロファージの分化の最終段階に作用すると考えられる¹⁷⁾。この様に組織によってマクロファージの M-CSF に対する反応性が異なっており、これはそれらマクロファージの M-CSF への依存度の差と思われるが、recombinant M-CSF を実験に使用していることも考慮する必要がある。M-CSF は分子の性状、分子量に多様性があり、水溶性、膜結合型、細胞基質に結合する proteoglycan 型の3種が知られている¹⁸⁾⁻²²⁾。一般に生理活性は同等と理解されているが、マクロファージの分化にそれらが異なった役割を果たしている可能性は否定できず、今後の検討が必要である。

op/op マウスにおける樹状細胞の分化

皮膚、リンパ節、胸腺などに存在する樹状細胞はマクロファージの近縁細胞とみなされているが、食能はほとんどなく、Tリンパ球に対し強力に抗原提示を行ってT細胞性免疫を誘導調節するなど、通常のマクロファージとは際だった差異を示す。本細胞は骨髄に起源し、その分化は GM-CSF によって誘導されることが最近 *in vitro* の研究から示唆されている。GM-CSF が樹状細胞の分化を誘導するのであれば、*op/op* マウスでは GM-CSF 産生は正常なので⁵⁾、樹状細胞は正常に分化するはずである。事実われわれは *op/op* マウスにも正常マウスとほぼ同数の樹状細胞が存在することを確認した²³⁾。*op/op* マウスの樹状細胞は樹状細胞に特異性の高いモノクローナル抗体 (NLDC-145, MIDC-8) に反応し、Ia 抗原や ATPase, ADPase 活性を有し、超微形態学的にも interdigitating cells では tubulovesicular bodies が発達し、表皮内のランゲルハンス細胞にはバーベック顆粒が検出される。これらの観察結果から、樹状細胞の分化には GM-CSF が必須であり、M-CSF は直接関与しないと結論される (図 9)。

op/op マウスの神経系の異常

著者らは *op/op* マウスは体格が小さく、歯がないためおとなしいマウスであると考えてきた。しかし、動作がきわめて緩慢で、音にも反応せず、歩行もふらついて

いるため、何らかの神経系の異常があることも推測された。組織学的に Wegiel らは *op/op* マウスの脳にミクログリアが少ないことを報告しており²⁴⁾、澤田らはマウス脳のミクログリア培養実験で *op/op* マウスでは正常マウスでみられる食食細胞の2つの集団のうち1つの亜群が欠損していることを見いだしている²⁵⁾。1995年9月に開催された CSF-1 シンポジウムで Pollard は *op/op* マウスの脳波の検討結果を報告し、本マウスにはほとんど視覚、聴覚がないことを明かにした。以上の成績から、本マウスがミクログリアの発生と起源の検討のみならず、大脳生理学的研究モデルとしても有用であることが示唆される。

炎症におけるマクロファージと M-CSF の作用

炎症巣においては血液中から単球が遊走・集積し、滲出マクロファージ、そして慢性肉芽腫性炎症では類上皮細胞、多核巨細胞へと分化する。しかし、組織に元来存在する在住マクロファージの炎症における関与についてはほとんど検討されていない。この問題も含め、*op/op* マウスは炎症における M-CSF の役割を解析する上にも有用なモデルである。粒子状のグルカンを静注すると肝に異物型の肉芽腫が形成される。*op/op* マウスにもグルカン静注後肝に少数の小型肉芽腫が形成される。またグルカン投与後在住マクロファージである Kupffer 細胞は旺盛な増殖能を発揮し、Kupffer 細胞から類上皮細胞、多核巨細胞への分化、成熟過程が観察された²⁶⁾。この結果はストロンチウム-89投与によって骨髄を選択的に照射し、極度の単球減少状態を惹起したマウスでのグルカン誘発肝肉芽腫形成成績とほぼ一致する²⁷⁾²⁸⁾。この2つの実験結果は炎症における単球由来滲出マクロファージの重要性を物語ると同時に、在住マクロファージのみでも肉芽腫が形成されることを示している。グルカンは M-CSF や GM-CSF 産生を亢進させることから、*op/op* マウスのマクロファージの分化、増殖には GM-CSF が重要な役割を演じるものと考えられる。

M-CSF 投与後 *op/op* マウス血中の単球が増加し、Kupffer 細胞も急速に増殖して、投与開始1週以内に Kupffer 細胞数は正常範囲に回復する²⁶⁾。Kupffer 細胞は形態学的にも、細胞化学的にも分化、成熟した細胞へと変態した。さらに M-CSF 投与 *op/op* マウスではグルカン誘発肝肉芽腫の形成が正常マウスに比較してむしろ亢進しており、多数の肉芽腫が早期から形成された。以上の所見から、M-CSF は単球系細胞の分化において必須な因子であるとともに、M-CSF 非依存性マクロファ

ジの増殖, 成熟機序に関与すると推定される。

妊娠における M-CSF の役割

血中や組織内の M-CSF は通常 2 倍程度の変動しか示さないのに対し, 妊娠マウスでは子宮内膜上皮から多量の M-CSF が産生され, その濃度は 1,000~10,000 倍にも増加する²⁹⁾。ヒトでは妊婦に単球増多症が経験的に知られており, 母体にも M-CSF の影響が及んでいることが推測される。子宮内膜の M-CSF は着床前から分泌され, M-CSF レセプターは胎盤のマクロファージのみならず, 脱落膜細胞や絨毛上皮にも発現する。最近習慣性流産の患者では M-CSF 濃度の低値が指摘されており, 着床や胎盤の分化に M-CSF が重要な役割を演じていると考えられる²⁹⁾⁻³¹⁾。ヘテロ (+/*op*) どのような組み合わせでは 1/4 の確率で *op/op* マウスが生まれるが, 胎児, 新生児期には母体由来の M-CSF の影響を受けるため正常マウスと外見上区別できず, 出生 10 日ころから発症する。これらの事実は妊娠の成立, 維持のために M-CSF が重要な役割を果たし, マクロファージ以外の細胞にも作用していることを示唆している。一方, 非妊娠状態の *op/op* マウスは同腹マウスに比べて子宮内膜, 卵巣においてマクロファージが極端に少なく¹¹⁾, マクロファージも妊娠の成立と維持に関与することが推測される。

興味あることに *op/op* マウスどうしてもでは妊娠しないが, *op/op* マウスの雌とヘテロ (+/*op*) の雄, またはその逆の組み合わせでは妊娠が成立する³²⁾。Roth らの検索では *op/op* マウスの雄とヘテロ (+/*op*) の雌の組み合わせでは *op/op* マウス胎仔の肝マクロファージは生下時まで正常で, 生後減少した。しかし, ホモの雌から生まれた *op/op* マウスは生下時すでに肝マクロファージは顕著に減少しており, 胎児のマクロファージの分化に母親由来の M-CSF の重要性が確認された³³⁾。しかしながら, ホモの雌が妊娠したことは妊娠の成立と維持における M-CSF の必要性に疑問を投げかけることにもなり, 今後の重要な問題点と考えられる。

おわりに

以上, M-CSF 活性欠如 *op/op* マウスを用いた検討から, 破骨細胞, マクロファージの分化における M-CSF の役割, M-CSF 非依存性マクロファージの存在, ミクログリアと M-CSF の関連, 樹状細胞と種々 CSF との関係および妊娠機序での M-CSF の関与などについて解説した。

単核食細胞系によれば, 各組織のマクロファージはすべて血液中の単球から分化した終末細胞であると定義されている¹⁾。しかし, マクロファージの多様性は胎生期から観察され³⁴⁾⁻³⁶⁾, 形態的にも機能的にも種々のマクロファージ亜群が存在する。M-CSF は内皮細胞, 線維芽細胞, 妊娠時の子宮内膜上皮など種々の細胞から産生され, 各組織においてマクロファージの微小環境形成の一役を担っている。*op/op* マウスの *in vivo* の検討から M-CSF 依存性マクロファージと非依存性マクロファージの, 少なくとも 2 つの亜群が存在し, 樹状細胞も M-CSF 非依存性であることが明らかにされた。*op/op* マウスは, 特に感染に弱いわけではなく, リンパ系に異常がないことに加えて樹状細胞が正常に分化していることが本マウスの免疫機構上重要な意味をもつと考えられる。機能面からみると, M-CSF はマクロファージの分化, 増殖, 生存を調節する他, コレステロール代謝, 妊娠, 乳腺や脳の発達などにも関与し, 乳癌や卵巣癌など女性生殖器腫瘍細胞では M-CSF やそのレセプターの発現がその増殖に関わっていることが明らかにされてきた。M-CSF 分子の機能の解明に *op/op* マウスから得られた研究成果は多大の貢献をしており, 今後も *op/op* マウスを用いた研究は M-CSF の多彩な生物活性, ことにマクロファージの分化機構における役割の解明に寄与することが期待される。

謝 辞

本研究にご助言を頂きました恩師小島 瑞名誉教授, ご協力いただきました熊本大学医学部病理学第 2 講座高橋 潔教授, 梅田修司先生, ジャクソン研究所 Leonard D. Shultz 博士, 防衛医科大学第 3 内科元吉和夫助教授, 森永乳業生物科学研究所に御礼申し上げます。

本研究の一部は平成 5 年度有壬基金による新潟大学医学部研究助成金を受けたものであり, 深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) van Furth, R.: Origin and turnover of monocytes and macrophages. Cell Kinetic of the Inflammatory Reaction. Current Topics in Pathology, Vol. 79 (Ed: Invesen, O.) Springer-Verlag, Berlin, 125~150, 1988.
- 2) Marks, S.C., Seifert, M.F. and McGuire, J.L.: Congenitally osteopetrotic (*op/op*) mice are not

- cured by transplants of spleen or bone marrow or spleen cells from normal littermates. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.*, **5**: 183~186, 1984.
- 3) **Seifert, M.F. and Marks, S.C.**: Congenitally osteosclerotic (*oc/oc*) mice are resistant to cure by transplantation of bone marrow or spleen cells from normal littermates. *Tissue Cell*, **19**: 29~37, 1987.
 - 4) **Yoshida, H., Hayashi, S-I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D. and Nishikawa, S-I.**: The murine mutation "osteopetrosis" (*op*) is a mutation in the coding region of the macrophage colony stimulating factor (*Csfm*) gene. *Nature*, **345**: 442~443, 1990.
 - 5) **Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W.Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K., Pollard, T.W. and Stanley E.R.**: Total absence of colony-stimulating factor in the macrophage-deficient osteopetrotic (*op/op*) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 4828~4832, 1990.
 - 6) **Marks, S.C.**: Morphological evidence of reduced bone resorption in osteopetrotic (*op*) mice. *Am. J. Anat.*, **163**: 157~167, 1982.
 - 7) **Wiktor-Jedrzejczak, W., Urbanowska, E., Aukerman, S.L., Pollard, J.W., Stanley, E.R., Ralph, P., Ansari, A-A., Sell, K.W. and Szperl, M.**: Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic *op/op* mouse suggests local, developmental, and humoral requirements for this growth factor. *Exp. Hematol.*, **19**: 1049~1054, 1991.
 - 8) **Felix, R., Cecchini, M.G. and Fleisch, H.**: Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the *op/op* osteopetrotic mouse. *Endocrinol.*, **127**: 2592~2594, 1990.
 - 9) **Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Niida, S., Ohgame, Y., Abe, M., Kumegawa, M. and Suda, T.**: Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, **173**: 269~272, 1991.
 - 10) **Wiktor-Jedrzejczak, W., Ahmed, A., Szczylik, C. and Skelly, R.R.**: Hematological characterization of congenital osteopetrosis in *op/op* mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J. Exp. Med.*, **156**: 1516~1527, 1982.
 - 11) **Naito, M., Hayashi, S-I., Yoshida, H., Nishikawa, S-I., Shultz, L.D. and Takahashi, K.**: Abnormal differentiation of tissue macrophage populations in "osteopetrosis" (*op*) mice defective in the production of macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Pathol.*, **139**: 657~667, 1991.
 - 12) **Felix, R., Cecchini, M.C., Hofstetter, W., Elford, P.R., Stutzer, A. and Fleisch, H.**: Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic (*op/op*) mouse. *J. Bone Miner. Res.*, **5**: 781~789, 1990.
 - 13) **Takahashi, K., Umeda, S., Shultz, L.D., Hayashi S-I. and Nishikawa, S-I.**: Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on the development, differentiation, and maturation of marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages in the spleen of osteopetrosis (*op*) mutant mice lacking functional M-CSF activity. *J. Leukoc. Biol.*, **55**: 581~588, 1994.
 - 14) **Wiktor-Jedrzejczak, W., Ratajczak, M.Z., Ptasznik, A., Sell, K.W., Ahmed-Ansari, A. and Ostertag, W.**: CSF-1 deficiency in the *op/op* mouse has differential effects on macrophage populations and differentiation stage. *Exp. Hematol.*, **20**: 1004~1010, 1992.
 - 15) **Cecchini, M.G., Dominguez, M.G., Mocchi, S., Wetterwald, A., Felix, R., Fleisch, H., Chisholm, O., Hofstetter, W., Pollard, J.W. and Stanley, E.R.**: Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development*, **120**: 1357~1372, 1994.
 - 16) **Umeda, S., Takahashi, K., Naito, M., Shultz, L.D. and Takagi, K.**: Neonatal changes of osteoclasts in osteopetrosis (*op/op*) mice defective in production of functional macrophage colony-

- stimulating factor (M-CSF) protein and effects of M-CSF on their development and differentiation. J. Submicr. Cytol. Pathol., **28**: (in press), 1996.
- 17) **Usuda, H., Naito, M., Umeda, S., Takahashi, K. and Shultz, L.D.**: Ultrastructure of macrophages and dendritic cells in osteopetrosis (*op*) mutant mice lacking macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) activity. J. Submicr. Cytol. Pathol., **26**: 111~119, 1994.
- 18) **Ladner, M.B., Martin, G.A. and Noble, J.A.**: Human CSF-1: gene structure and alternative splicing of mRNA precursors. EMBO J., **6**: 2693~2698, 1987.
- 19) **Wong, G.G., Temple, P.A. and Leary, A.C.**: Human CSF-1: molecular cloning and expression of 4kb cDNA encoding the hematopoietin and determination of the complete amino acid sequence of the human urinary protein. Science, **235**: 1504~1508, 1987.
- 20) **Price, L.K., Choi, H.U., Rosenberg, L. and Stanley, E.R.**: The predominant form of secreted colony stimulating factor-1 is a proteoglycan. J. Biol. Chem., **267**: 2190~2199, 1992.
- 21) **Suzu, S., Otsuki, T., Makishima, M., Yanai, N., Kawashima, T., Nagata, N. and Motoyoshi, K.**: Biological activity of a proteoglycan form of macrophage colony-stimulating factor and its binding to type V collagen. J. Biol. Chem., **267**: 16812~16815, 1992.
- 22) **Suzu, S., Otsuki, T., Yanai, N., Takatsu, Z., Kawashima, T., Takaku, F., Nagata, N. and Motoyoshi, K.**: Identification of a high molecular weight macrophage colony-stimulating factor as a glycosaminoglycan-containing species. J. Biol. Chem., **267**: 4345~4348, 1992.
- 23) **Takahashi, K., Naito, M., Shultz, L.D., Hayashi, S-I. and Nishikawa, S-I.**: Differentiation of dendritic cell populations in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice homozygous for the osteopetrosis (*op*) mutation. J. Leukoc. Biol., **53**: 19~28, 1993.
- 24) **Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Dziewiatkowski, J., Kozielski, R., Trenkner, E. and Wiktor-Jedrzejczak, W.**: Normal brain perivascular cells and reduced numbers of microglial cells in CSF-1-deficient *op/op* mouse. 10th MCDB/ISU Symposium. Symposium on Colony Stimulating Factor-1: Molecular Mechanisms in Development and Disease. Sept. 21~24, 1995, Ames, Iowa. Abstract p.25.
- 25) **澤田 誠**: ミクログリアの発生と多様性. 細胞, **27**: 193~198, 1995.
- 26) **Takahashi, K., Naito, M., Umeda, S. and Shultz, L.D.**: The role of macrophage colony-stimulating factor in hepatic glucan-induced granuloma formation in the osteopetrosis (*op*) mutant mouse defective in the production of macrophage colony-stimulating factor. Am. J. Pathol., **144**: 1381~1392, 1994.
- 27) **Yamada, M., Naito, M. and Takahashi, K.**: Kupffer cell proliferation and glucan-induced granuloma formation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. J. Leukoc. Biol., **47**: 195~205, 1990.
- 28) **Naito, M. and Takahashi, K.**: The role of Kupffer cells in glucan-induced granuloma formation in the liver of mice depleted of blood monocytes by administration of strontium-89. Lab. Invest., **64**: 664~674, 1991.
- 29) **Pollard, J.W., Bartucci, A., Arcucci, R., Orlofsky, A., Ladner, M.B. and Stanley, E.R.**: Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. Nature, **330**: 484~486, 1987.
- 30) **Regensstreif, L. and Rossant, J.**: Expression of the *c-fms* proto-oncogene and of the cytokine, CSF-1, during mouse embryogenesis. Dev. Biol., **133**: 284~294, 1989.
- 31) **Arcucci, R.J., Shanahan, F., Stanley, E.R. and Pollard, J.W.**: Temporal expression and location of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and its receptor in the female reproductive tract are consistent with CSF-1-regulated placental development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**: 8818~8822, 1989.
- 32) **Pollard, J.W., Hunt, J.S., Wiktor-Jedrzejczak, W. and Stanley, E.R.**: A pregnancy defect in

the osteopetrotic (*op/op*) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev. Biol.*, **148**: 273~283, 1991.

- 33) **Roth, P., Dominguez, M. and Stanley, E.R.:** The effects of CSF-1 on the distribution of macrophages in the developing osteopetrotic (*op/op*) mouse. 10th MCDB/ISU Symposium. Symposium on Colony Stimulating Factor-1: Molecular Mechanisms in Development and Disease. Sept. 21~24, 1995, Ames, Iowa. Abstract p.26.
- 34) **Takahashi, K., Yamamura, F. and Naito, M.:** Differentiation, maturation and proliferation of

macrophages in the mouse yolk sac: A light-microscopic enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J. Leukoc. Biol.*, **45**: 87~96, 1989.

- 35) **Naito, M., Yamamura, F., Nishikawa, S-I. and Takahashi, K.:** Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures. *J. Leukoc. Biol.*, **46**: 1~10, 1989.
- 36) **Naito, M., Takahashi, K. and Nishikawa, S-I.:** Development, differentiation and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *J. Leukoc. Biol.*, **48**: 27~37, 1990.
-