

# 出生後のラット肺胞マクロファージにおける PU.1の発現とサーファクタント代謝

岩 渕 晴 子

新潟大学大学院医歯学総合研究科

内部環境医学講座小児科学分野

(主任：内山 聖教授)

## PU.1 Expression Plays A Pivotal Role in Alveolar Macrophage Differentiation and Surfactant Catabolism in Newborn Rats

Haruko IWABUCHI

*Division of Pediatrics, Department of Homeostatic Regulation and Development,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Makoto UCHIYAMA)*

### 要 旨

PU.1はマクロファージを含む骨髄球系細胞とBリンパ球の発生に不可欠な造血転写因子である。特発性肺胞蛋白症 (idiopathic pulmonary alveolar proteinosis: IPAP) や granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 欠損マウスの解析から、PU.1の発現が肺胞マクロファージの最終機能分化とサーファクタントの異化に重要であることが知られている。哺乳類においては生後ダイナミックに変化する呼吸環境の中で、サーファクタントの代謝と肺胞マクロファージの分化成熟にもPU.1は重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、生後のラット肺胞マクロファージおよび培養単球におけるPU.1の発現とサーファクタントの成分であるsurfactant protein B (SP-B)の代謝について検討した。生直後の肺胞マクロファージにはPU.1の発現はほとんど見られないが、生後1週間でPU.1陽性肺胞マクロファージは増加し、PU.1の発現も増強した。一方、生直後の肺胞マクロファージには多量のSP-Bの取り込みが見られ、1週間には減少した。成熟ラットの単球にPU.1の発現は見られないが、GM-CSF存在下で培養すると日数の経過につれて形態的にマクロファージに分化し、PU.1の発現・増強が見られ、人工サーファクタント製剤の取り込みと分解が確認された。以上、生直後の肺胞マクロファージではPU.1の発現とSP-Bの異化は不十分で、生後1週間を境にPU.1の発現が増加し、SP-Bの異化能が亢進することが明らかにされた。これらの知見から新生児期のサーファクタント代謝における肺胞マクロファージの重要性が示された。

キーワード：PU.1, サーファクタント, 肺胞マクロファージ, 取り込みと異化, ラット

Reprint requests to: Haruko IWABUCHI  
Division of Pediatrics, Department of  
Homeostatic Regulation and Development  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座  
小児科学分野 岩 渕 晴 子

## 緒 言

Ets 遺伝子ファミリーに属する PU.1 は granulocyte - macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) によって発現が制御される造血転写因子で、骨髄球系細胞および B リンパ球の発生に不可欠である<sup>1)2)</sup>。近年、特発性肺胞蛋白症 (idiopathic pulmonary alveolar proteinosis: IPAP) の病態生理において、PU.1 が肺胞マクロファージの最終機能分化に重要な役割を果たしていることが注目されている<sup>3)</sup>。IPAP は、肺胞および呼吸細気管支内にサーファクタントが貯留する稀な肺疾患で<sup>4)5)</sup>、患者の血中や肺胞腔内に抗 GM-CSF 抗体が産生されるため<sup>6)7)</sup>、GM-CSF のシグナルが阻害されて PU.1 の発現が誘導されず、肺胞マクロファージの機能異常を惹起する。

GM-CSF 欠損マウスでは造血系に重大な異常は見られないが、IPAP と同様の呼吸器症状を呈する<sup>8)</sup>。両病態の肺胞マクロファージには様々な共通の機能異常が見いだされているが<sup>5)</sup>、これらの異常は GM-CSF の作用によって改善し、PU.1 も発現する<sup>9) - 11)</sup>。この事実から、GM-CSF と PU.1 が肺胞マクロファージの成熟とサーファクタント代謝に重要な役割を果たしているものと推察される。

サーファクタントは II 型肺胞上皮で合成される。ヒトにおいて、サーファクタントの合成開始はおよそ胎齢 22 週以降で、妊娠満期時には多量に産生され、生後 1-2 週には成人レベルまで減少する。合成・分泌されたサーファクタントは II 型肺胞上皮や肺胞マクロファージによって再利用、もしくは異化される<sup>12)13)</sup>。このように出生後大きく変動する呼吸環境の中で、肺胞マクロファージの分化成熟とサーファクタントの異化に PU.1 は重要な役割を果たしていると考えられる。これまで、IPAP や GM-CSF 欠損マウスにおける肺胞マクロファージの成熟と PU.1 の関連については多くの研究がなされているが、出生後における肺胞マクロファージの分化成熟と PU.1 の関連は明らかにされていない。

本研究では、生後ラット肺胞マクロファージの

分化成熟過程における PU.1 の発現と surfactant protein B (SP-B) の代謝について検討した。生後のサーファクタントのホメオスタシス維持における PU.1 の重要性を考える上で興味深い結果を得たので報告する。

## 材料と方法

### 1. 実験動物および末梢血単核細胞

出生日齢 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21, 56 日の Wistar ラット (Charles River Japan, 神奈川, 日本) を使用した。ラットを麻酔下に屠殺し、それぞれ肺、肝臓、脾臓、消化管、腎臓、副腎、膵臓、心臓、胸腺を摘出した。培養には 8-10 週齢の Wistar ラットの下大静脈より血液を無菌的に採血し、15 ml 遠心チューブに Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) 3 ml を加え 6 ml の血液を静置し、1500 rpm, 20 分間遠心して単核球を分離した。単核球は 0.3 % トリパンブルーで染色し、細胞数を算出した。

### 2. 免疫組織化学染色法

摘出した各臓器は 10 % 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、3 μm 厚に薄切した。パラフィン切片は、脱パラフィン後、加熱処理で賦活化を行い、内因性ペルオキシダーゼを阻害し、10 % 正常動物血清で非特異的反応を阻止した。一次抗体はマウス抗ラット単核球/マクロファージモノクローナル抗体 ED1 (BMA Biomedicals, Augst, Switzerland)、ウサギ抗 PU.1 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、ウサギ抗ヒツジサーファクタント蛋白 (SP-B) ポリクローナル抗体 (CHEMICON International, Temecula, CA) を使用した。二次抗体はシンプルステインラット MAX-PO (MULTI) (株式会社ニチレイ, 東京)、anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase linked F(ab')<sub>2</sub> fragment (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を使用した。3,3'-diaminobenzidine (DAB) (同仁化学研究所, 熊本) にて可視化し、ヘマトキシリンで核染色を行った。肺胞マクロファージにおける ED1, PU.1 の発現は、光学顕微鏡下で単位面

表 1 PCR に用いた各種プライマーセットと反応産物

mRNA	Primers	Sequence	Product
PU.1	Forward	5'-CCTTGATTGGTGGTGATGGAGAC-3'	161 bp
	Reverse	5'-CAGCTCCATGTGGCGGTAGA-3'	
GM-CSF	Forward	5'-AGACCCGCCTGAAGCTATACAA-3'	89 bp
	Reverse	5'-CTGGTAGTGGCTGGCTATCATG-3'	
PPAR $\gamma$	Forward	5'-ACTCCCATTCTTTGACATC-3'	265 bp
	Reverse	5'-TCCCCACAGACTCGGCACTC-3'	
Mannose	Forward	5'-ATGACAACCACTGTGGCAAA-3'	155 bp
	Reverse	5'-ACAGGCTAGGCTGCTATCCA-3'	
$\beta$ -actin	Forward	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	348 bp
	Reverse	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

Mannose: mannose receptor

積あたり ( $/\text{mm}^2$ ) の陽性細胞数を算出した。SP-B 陽性肺胞マクロファージにおける SP-B の染色性は強陽性、陽性、陰性の 3 段階評価として、1 個体あたり 200 個の肺胞マクロファージを観察し、比率を算出した。PU.1 陽性細胞が肺胞マクロファージであることを確認するため、抗 ED1 抗体と抗 PU.1 抗体を用いて二重染色を行った。二重染色の発色は、ED1 を 4-chloro-1-naphthol (青) で、PU.1 を DAB (茶) で行った。

培養した単球は回収後、サイトスピン (700 rpm, 3 分) で標本作製し、May-Giemsa 染色で形態評価を行った。免疫組織化学染色 (以下、免疫染色) で ED1 と PU.1 の発現を観察した。サーファクタントの取り込み・異化の評価は、SP-B に対する免疫染色とリン脂質染色 (酸ヘマチン法) で行った。PU.1, SP-B に対する免疫染色とリン脂質染色は 10% 緩衝ホルマリンで固定を行い、ED1 に対する免疫染色は 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。以降、パラフィン切片と同様の方法で免疫染色を行った。4% パラフォルムアルデヒド固定標本には加熱処理を行わなかった。

### 3. RNA の抽出と RT-PCR, real time PCR 法

各出生日齢の Wistar ラットより摘出した肺から

acid guanidinium-phenol-chloroform 法を用いて total RNA を抽出した。1  $\mu\text{g}$  の total RNA を、4  $\mu\text{l}$  の逆転写酵素バッファー (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2  $\mu\text{l}$  の 0.1M dithiothreitol (Invitrogen), 0.5  $\mu\text{l}$  の RNase inhibitor (Promega, Madison, Wis), 1  $\mu\text{l}$  の 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2  $\mu\text{l}$  の random primer (Promega), 0.5  $\mu\text{l}$  の reverse transcriptase (Invitrogen) と混和して総量 20  $\mu\text{l}$  とした。混合物は 42  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分インキュベート後、95  $^{\circ}\text{C}$  3 分加熱して cDNA を作成した。PCR は TP cyclor 100 (Toyobo, 大阪) を用いて行った。反応液には 1  $\mu\text{l}$  の cDNA, 2  $\mu\text{l}$  の PCR reaction buffer, 1.2  $\mu\text{l}$  の 25mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.6  $\mu\text{l}$  の 2.5mM dNTP, 0.2  $\mu\text{l}$  の 5U/ $\mu\text{l}$  Taq polymerase (Promega), 0.4  $\mu\text{l}$  ずつの 10mM primer を加えて総量 20  $\mu\text{l}$  とした。プライマーは表 1 を用い、PCR の反応は PU.1, GM-CSF, proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), mannose receptor: denature 95  $^{\circ}\text{C}$  30 秒, annealing 55  $^{\circ}\text{C}$  30 秒, extension 72  $^{\circ}\text{C}$  30 秒, 25 サイクル,  $\beta$ -actin: denature 95  $^{\circ}\text{C}$  60 秒, annealing 55  $^{\circ}\text{C}$  60 秒, extension 72  $^{\circ}\text{C}$  60 秒, 20 サイクルで行った。

Real time PCR は chromo 4 four-color real-

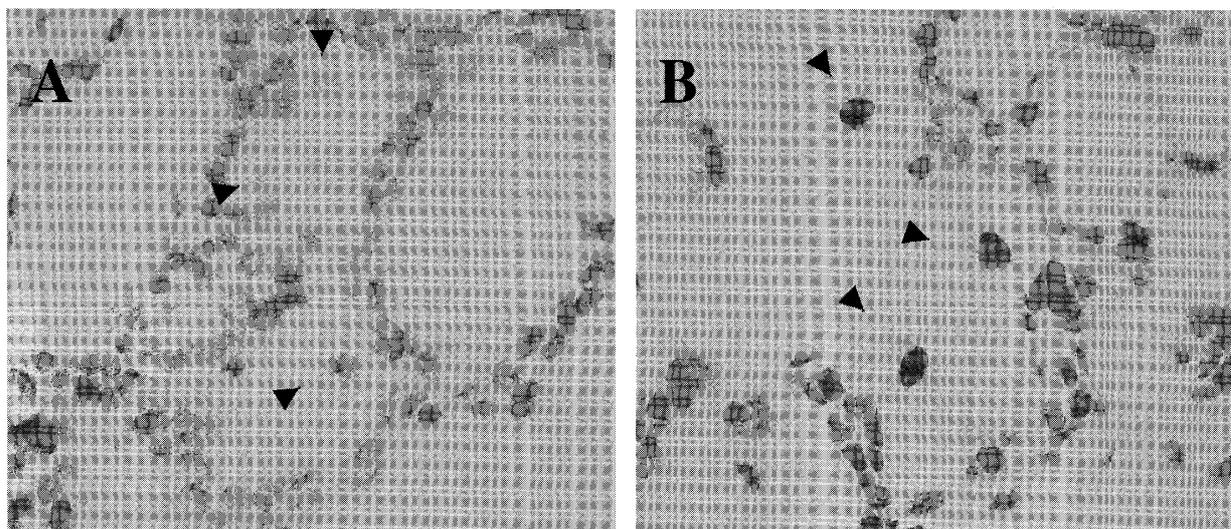


図1 生後の肺胞マクロファージのPU.1免疫染色(×1000)

A: 生後1日. 肺胞マクロファージのPU.1発現は陰性ないし弱陽性. B: 生後15日では, PU.1の染色性が増加した. 矢印: 肺胞マクロファージ.

time PCR system (BIO RAD, Hercules, CA) で SYBR green 法を用いた. 指数関数的増幅開始サイクル数 (Ct 値) は, Opticon monitor ver 3.0 で解析し,  $\beta$ -actin で相対定量化した. プライマーは RT-PCR と同一で, 反応はいずれも denature 95 °C 10 秒, annealing 55 °C 30 秒, extension 72 °C 30 秒, 40 サイクルで行った.

#### 4. 培養単球における人工サーファクタント製剤の取り込みと異化

前述の方法で分離した単核球は  $1 \times 10^6$  個ずつ Lab-Tek glass 2 well chamber slide (Nalge Nunc International, Rochester, NY) に分けた. RPMI 1640 無血清培地 (Sigma, St. Louis, MO), 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 下で 2 時間培養後, 上清を吸引し, 10 % 非働化ウシ胎児血清, penicillin (10000U/ml), streptomycin (10mg/ml) 含有 RPMI 1640 培地に GM-CSF (BERLEX, Richmond, CA)  $1 \times 10^3$  IU/ml を添加し 5 日間培養した. 培養 5 日目に, 人工肺サーファクタント製剤サーファクテン (三菱ウェルファーマ株式会社, 大阪) を 0.1 % となるように加え 24 時間培養した. 取り込まれたサーファクテンの分解を観察するため, 培養液を吸引洗

浄して GM-CSF  $1 \times 10^3$  IU/ml 存在下で更に 24 時間培養し, 細胞を回収した. 対照群では GM-CSF を添加せず同様に培養を行った.

#### 5. 統計学的検討

ED1, PU.1, SP-B 陽性細胞の算定は, それぞれ 3 個体について行い, 平均値と標準誤差を算出した. Real time PCR の反応は 3 個体からの検体をそれぞれ 2 回行い, 平均値と標準誤差を算出した.

## 結 果

### 1. 各組織マクロファージにおける PU.1 の発現

免疫組織学的に, 肺, 肝臓, 脾臓, 消化管, 腎臓, 副腎, 膵臓, 胸腺に PU.1 陽性細胞が認められた. 二重染色で ED1 が細胞質に, PU.1 が核に陽性であることから, PU.1 陽性細胞はマクロファージであることを確認した. 各組織マクロファージは生後 1 日から PU.1 を発現していた. 肺胞マクロファージだけは出生後しばらくは染色性が陰性ないし弱陽性で, 陽性細胞も少数であった (図 1 A). 肺胞マクロファージ以外の組織マクロファ

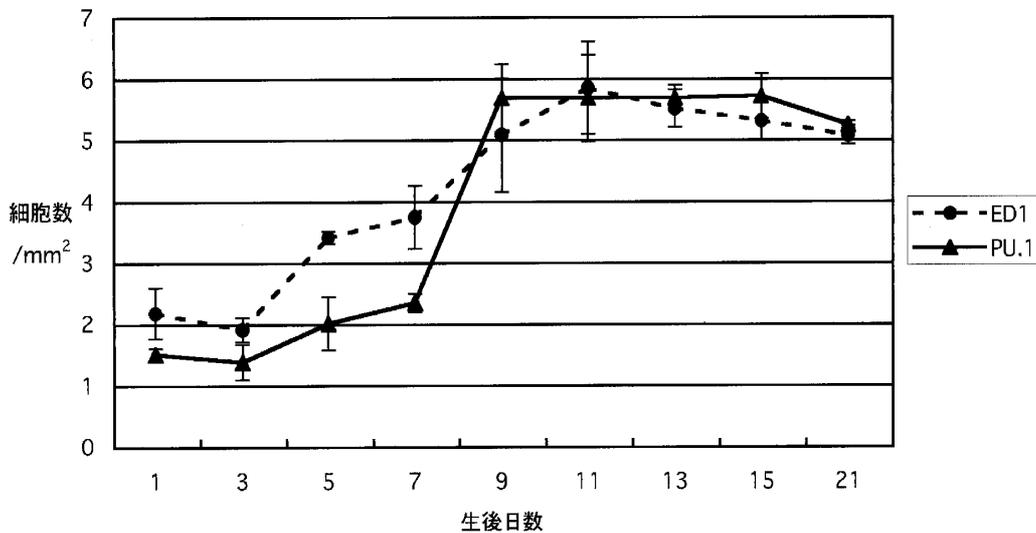


図2 PU.1, ED1 陽性肺胞マクロファージ数の変化

生後9日目にPU.1陽性細胞数は約3倍に増加した。ED1陽性細胞数は生後徐々に増加した。

ージは染色性，陽性細胞数ともに生後日数による変化は認められなかった（データ未提示）。

## 2. 肺胞マクロファージにおける PU.1 および SP-B 陽性細胞数

生後7日まではPU.1陽性細胞数に変化はなかったが，生後9日に約3倍に増加した（図2）。生後15日には，染色性の増強が見られた（図1B）。ED1陽性細胞数は生後徐々に増加した（図2）。

サーファクタントのマーカである SP-B の発現は，II型肺胞上皮および肺胞マクロファージの細胞質内に認められた（図3）。生後間もない時期の肺胞マクロファージは染色性が強く（図3A），大型であったが，生後15日では染色性が低下し，サイズも小さくなった（図3B）。生後11日以降，陽性細胞数は減少し，わずかになった（図4）。

## 3. 肺組織の mRNA 発現

RT-PCRでは，PU.1は生後9日より発現が増加した（データ未提示）。real time PCRにおいても生後1週間で4-5倍に，生後2週間で約20倍に発現量が増加した（図5）。GM-CSF, PPAR $\gamma$ , mannose receptor の発現は，RT-PCRで生後

徐々に増加する傾向が見られた（データ未提示）。

## 4. GM-CSF 添加ラット培養単球のマクロファージへの分化と機能評価

GM-CSF 添加5日後の培養単球の形態学的変化およびマクロファージマーカーの変化を観察した。May-Giemsa 染色では，培養2時間後の単球は細胞質に乏しく小型であったが（図6A），GM-CSF 添加5日後の細胞は細胞質が豊富で大型の類円形の形態を呈し，マクロファージ様であった（図6B）。PU.1の免疫染色では培養2時間後の単球は陰性であったが（図6C），GM-CSF 添加培養5日後には核に陽性像が観察された（図6D）。GM-CSF 非添加群の細胞は，GM-CSF 添加群に比べ小型で類円形の形態を呈し，PU.1の核内発現はわずかであった（データ未提示）。ED1は単球，GM-CSF 添加群，GM-CSF 非添加群の細胞ともに細胞質に陽性であった（データ未提示）。

この培養系の GM-CSF 添加群にサーファクテンを加えると，マクロファージは泡沫状となって更に大型化し（図7A），SP-B 免疫染色，リン脂質染色で陽性となった（図7B, C）。サーファク

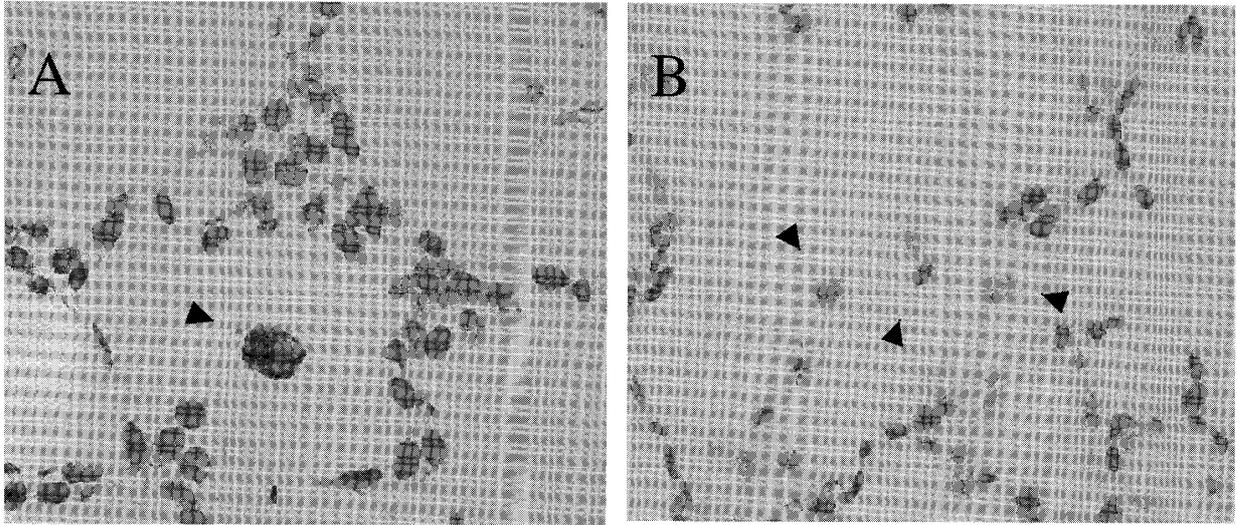


図3 生後の肺胞マクロファージのSP-B免疫染色(×1000)

A: 生後1日. 肺胞マクロファージの胞体内には多量のサーファクタントを容れ, 大型化している.  
B: 生後15日では染色性が低下した. 矢印: 肺胞マクロファージ.

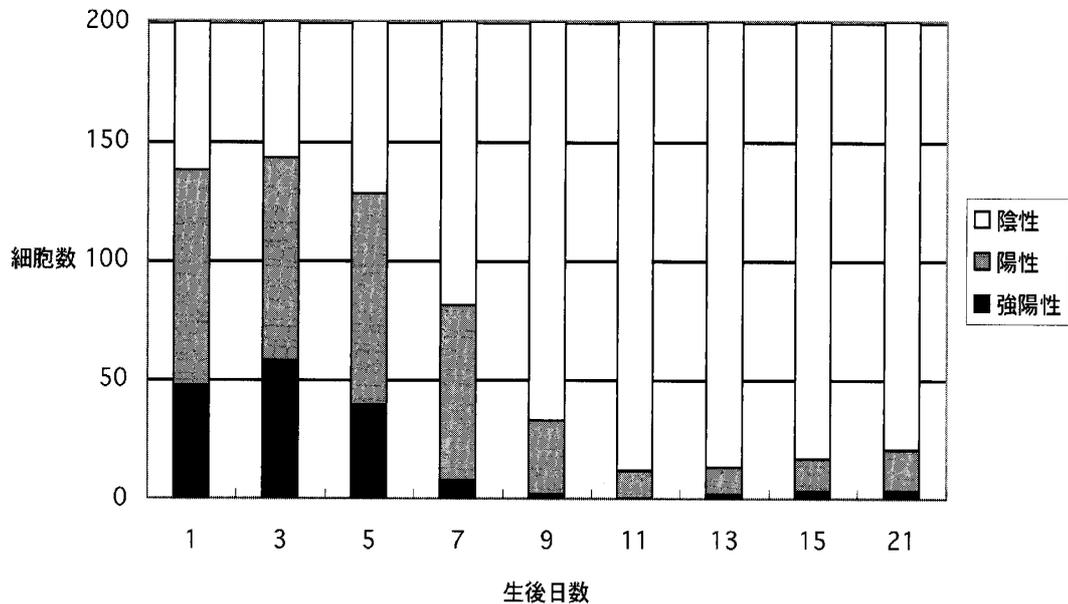


図4 生後のSP-B陽性肺胞マクロファージ数の変化

生後11日以降, 陽性細胞は減少した.

テンを取り込んだマクロファージを, サルファク  
テン洗浄除去後 GM-CSF 存在下で 24 時間培養

すると, 泡沫状の細胞質は消失して小型化した  
(図7D).

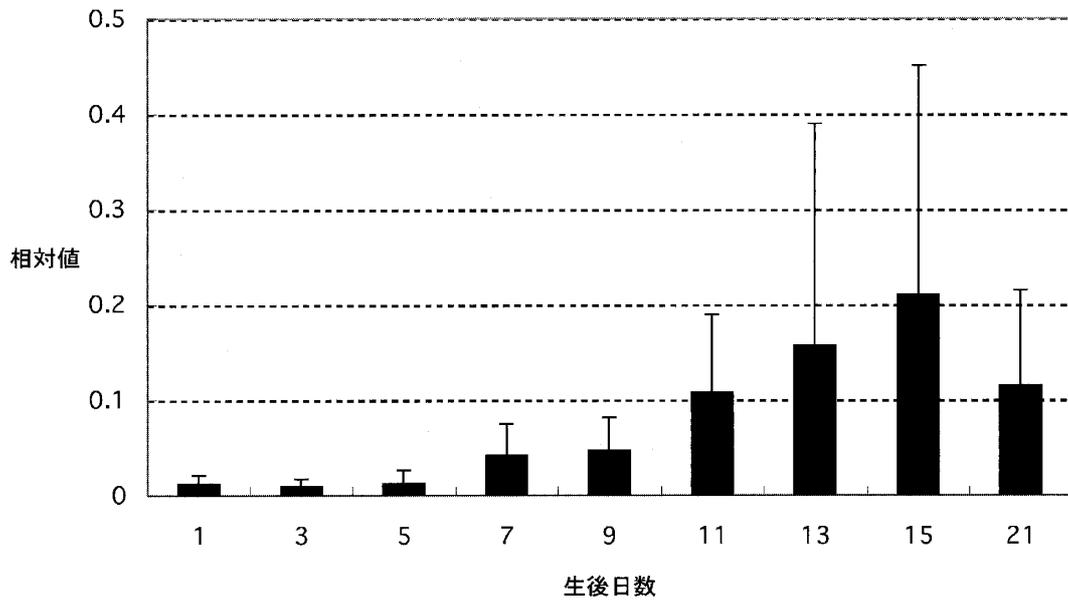


図5 生後の肺組織における PU.1 mRNA の発現 (real time PCR)  
 生後1週間で4~5倍に, 生後2週間で約20倍に増加した。

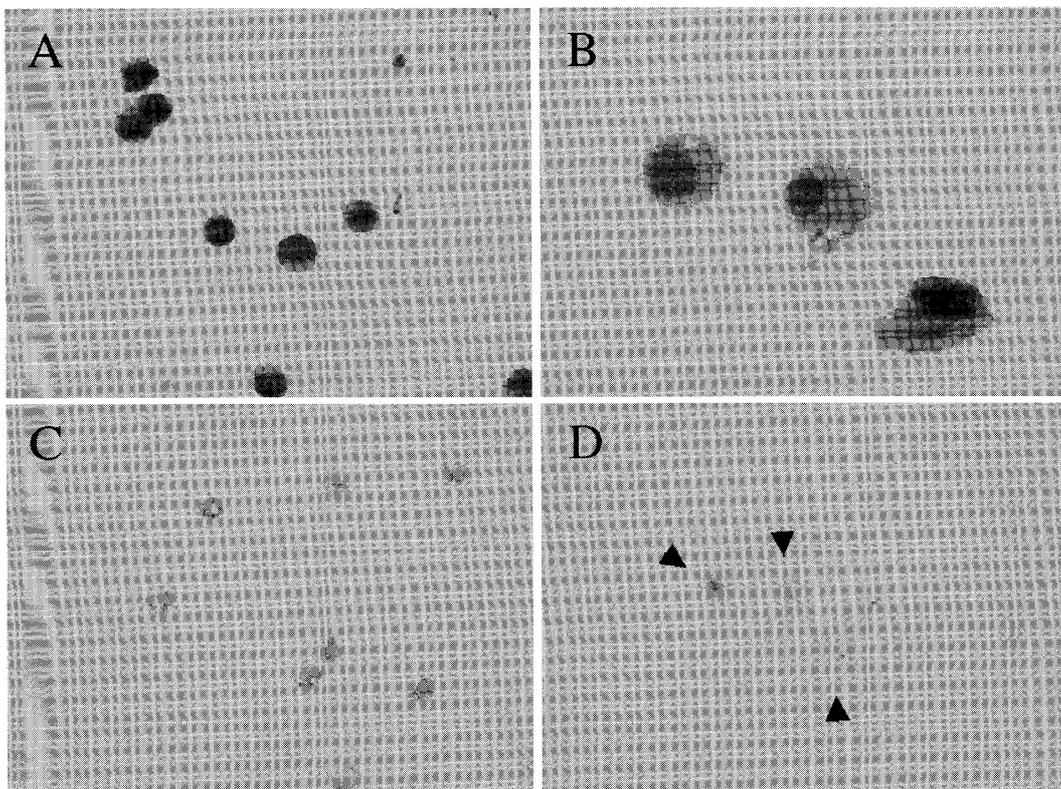


図6 GM-CSF 添加培養におけるラット単球の形態変化と PU.1 免疫染色 (×1000)  
 A : 培養2時間後の単球は細胞質に乏しく小型であった. B : GM-CSF 添加5日後には大型のマクロファージになった. C : 培養2時間後の単球は PU.1 陰性であった. D : GM-CSF 添加5日後の細胞では核に PU.1 の発現が観察された. A, B : May-Giemsa 染色.

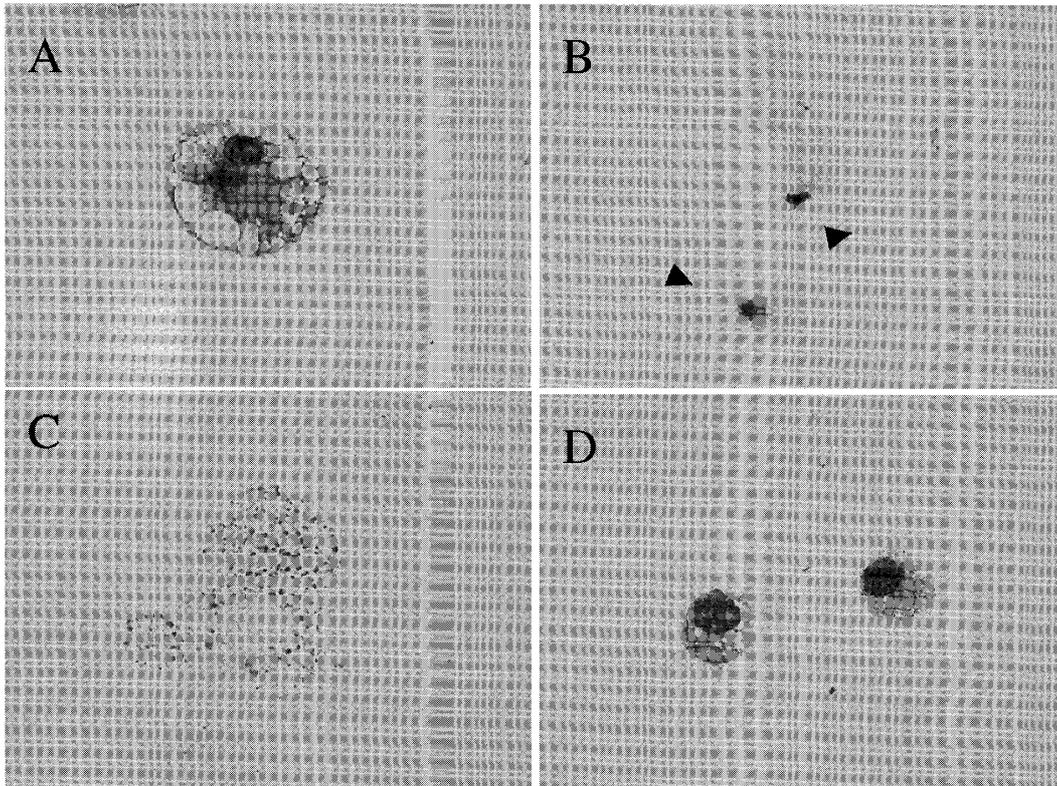


図7 GM-CSF添加培養単球マクロファージのサーファクテン取り込み・分解 (×1000)

A: サーファクテンを24時間加えて培養したマクロファージは細胞質が大型化し、泡沫状になった。B: SP-B免疫染色で細胞質に陽性像を認めた。C: リン脂質染色(酸ヘマチン法)で細胞質に顆粒状の陽性像を認めた。D: サーファクテン洗浄除去後GM-CSF存在下で24時間培養後には、泡沫状の細胞質が消失し小型化した。A, D: May-Giemsa染色。

## 考 察

生後、新生児は呼吸を開始するが、外気を吸入して肺胞を拡張させることは自力で生きるために必須の営みである。その際、サーファクタントは肺胞を伸展させる大きな力となる。ヒトのサーファクタントの合成は胎齢22週頃から肺のⅡ型肺胞上皮細胞で開始され、妊娠時期の経過につれて増加し、サーファクタント量は出生直後が最も多く、生後1-2週間の間に成人レベルまで減少する<sup>12)13)</sup>。この産生パターンは他の哺乳類でも観察されている<sup>14)-17)</sup>。サーファクタントの不足は呼吸窮迫症候群を招き、合成サーファクタント

の投与が劇的効果をあげることから、呼吸機能の未熟な新生児には豊富なサーファクタントが有利に作用していると考えられる。それに対して、IPAPはサーファクタント過剰による稀な肺疾患であり、肺胞および呼吸細気管支内にサーファクタントが貯留し、換気障害を生じる<sup>4)5)</sup>。このように、肺サーファクタントの恒常性の確保は呼吸機能の維持に不可欠である。サーファクタントの代謝経路には、産生、貯蔵、分泌、再利用、異化などの過程があり、Ⅱ型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージが重要な役割を果たしている。

Ets遺伝子ファミリーに属するPU.1は骨髄球系細胞およびBリンパ球の発生に不可欠な造血

転写因子で、PU.1 ノックアウトマウスは組織や胎生造血巣のマクロファージやBリンパ球を欠損する<sup>1)2)</sup>。この転写因子はGM-CSFによって発現が制御されることが知られている。DranoffらはGM-CSF欠損マウスは造血系に重大な異常を生じないが、生後IPAPと同様の症状を呈することを報告した<sup>8)</sup>。IPAP患者とGM-CSF欠損マウスの肺胞マクロファージは形態的に未熟であり、機能的には非特異的エステラーゼ染色の低下、PU.1発現の低下、接着能の低下、細菌・真菌・異物の貪食能の低下、Toll-like receptor (TLR) 2, TLR 4, mannose receptor, FC $\gamma$  receptorの発現低下、サーファクタント異化能の低下などの共通点がある<sup>5)</sup>。GM-CSF欠損マウスの肺にGM-CSFを強制発現させるか、もしくはIPAP症例にGM-CSFを投与しPU.1の発現が回復すると、肺胞マクロファージは形態的に成熟し、機能的にも回復する<sup>9)–11)</sup>。近年IPAPの病因は抗GM-CSF抗体産生によるGM-CSFの中和作用であることが明らかにされた<sup>6)7)</sup>。つまり、抗GM-CSF抗体によるPU.1の発現低下が肺胞マクロファージの免疫応答とサーファクタント異化能の障害を惹起し、易感染性と肺内のサーファクタント過剰貯留を生じると考えられる。これらの事実より、PU.1が肺胞マクロファージの最終機能分化と肺のサーファクタントホメオスターシスに不可欠であり、PU.1の発現にはGM-CSFが重要であると考えられる<sup>11)</sup>。このように、GM-CSF欠損マウスやIPAPの研究から肺胞マクロファージの成熟や機能発現に関するGM-CSFやPU.1の作用が明らかにされてきた。しかし、出生後の生理的呼吸環境においてGM-CSFやPU.1が肺胞マクロファージの分化成熟やサーファクタント代謝に及ぼす作用については十分な検討がなされていなかった。

本研究ではまず免疫組織学的に肺胞マクロファージにおけるPU.1の発現を検討した。PU.1は生後1日からラットの各組織のマクロファージに発現していたが、唯一肺胞マクロファージは生後しばらく発現が低く、生後1週間を境に発現が増加したことから、肺はマクロファージの分化という

点で特異な組織環境を形成していることが示唆された。GM-CSFの蛋白発現は免疫組織学的に検索できなかったが、mRNAは生後徐々に発現が増加した。一方、気管支肺胞洗浄によって得られた肺胞マクロファージを用いたRT-PCRではGM-CSFの発現は見られなかった（データ未提示）ことから、肺組織でのGM-CSFはII型肺胞上皮細胞由来と考えられた。以上の成績から、生直後にPU.1の発現が少ない肺胞マクロファージでは、GM-CSFの産生増加につれてPU.1の発現が増加するものと考えられた。

次に肺胞マクロファージのSP-Bの取り込みを免疫染色で検討したところ、生後間もない肺胞マクロファージは多量のSP-Bを含有して大型であり、生後1週間以降細胞内SP-Bは減少した。このことは、生直後の肺胞マクロファージはサーファクタント処理機能が低い、急速にその機能が亢進することを示唆している。さらに、肺胞マクロファージの前駆細胞と考えられるラット単球をGM-CSF存在下で分化させマクロファージへ形態変化させると、免疫染色ではPU.1の発現が核に認められた。このマクロファージは人工サーファクタント製剤を取り込んで一時大型化するが、細胞内サーファクタント製剤は分解され、細胞は小型化した。このように、GM-CSF存在下で単球由来マクロファージのPU.1発現は増加し、人工サーファクタント製剤の取り込みと分解機能を発揮した。この結果は、組織学的に観察されたラット肺胞マクロファージの生後の形態変化とサーファクタント代謝を裏付けるものと解釈される。

本研究ではさらにPU.1やGM-CSFによって制御されるマクロファージ関連分子の生後の肺組織における発現を検討した。mannose receptorは細菌や異物の貪食に関与し、感染防御の最前線で重要な役割を演じており、その発現はPU.1依存性である<sup>18)</sup>。PPAR $\gamma$ は糖・脂質代謝、炎症、免疫応答に関与する種々の標的遺伝子を調節する転写因子で分化したマクロファージに発現するが、これはGM-CSFにより発現が制御される<sup>19)20)</sup>。両者ともIPAP患者の肺胞マクロファージでは発

現が低下しており, GM-CSF 吸入療法により発現が回復する<sup>9)21)</sup>. 本研究では, mannose receptor, PPAR  $\gamma$  は mRNA レベルでは生後徐々に発現が増加する傾向が見られた. GM-CSF や PU.1 の発現も生後徐々に増加したことから, これら分子は肺胞マクロファージの分化成熟に関連するものと考えられた.

以上, ラットの肺胞マクロファージは, PU.1 の発現に伴いサーファクタントの処理能を獲得すると考えられた. これは, サーファクタント産生量が大きく変化する新生児期でのサーファクタントホメオスターシスの維持に PU.1 によって制御される肺胞マクロファージの分化成熟と機能が深く関わっていることを意味する. さらに, 培養系において GM-CSF 存在下で単球由来マクロファージの PU.1 の発現増加と形態的・機能的成熟を確認できた. 今後, GM-CSF による肺胞マクロファージの PU.1 発現制御機序を生体内においても明らかにすることが必要と思われる.

## 結 語

生後ラット肺胞マクロファージにおける PU.1 の発現とサーファクタント蛋白 B の取り込みの変化について検討した. また, ラット単球を GM-CSF 存在下で培養し, PU.1 の発現の変化と人工サーファクタント製剤の取り込み・異化について検討した. ラットの肺胞マクロファージは, PU.1 の発現に伴いサーファクタントの異化能を獲得すると考えられた.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導を頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講座小児科学分野 内山 聖教授, 実験の計画および実技の指導, 論文校閲を頂きました同細胞機能講座分子細胞病理学分野 内藤 眞教授, 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 中田 光教授に深謝致します. また, 本研究に関して助言・協力を頂いた長谷川 剛助教授, 山本 尚助手, 川崎 隆助手, 百崎 進技官, 大谷内健二技官, 青山 崇技官, 佐久間理子技官をはじめ教室の皆様にお礼申し上げます.

## 引用文献

- 1) McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ and Maki RA: Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15: 5647 - 5658, 1996.
- 2) Fisher RC and Scott EW: Role of PU.1 in hematopoiesis. *STEM CELLS* 16: 25 - 37, 1998.
- 3) Trapnell BC and Whitsett JA: GM-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu. Rev. Physiol* 64: 775 - 802, 2002.
- 4) Trapnell BC, Whitsett JA and Nakata K: Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 349: 2527 - 2539, 2003.
- 5) Presneill JJ, Nakata K, Inoue Y and Seymour JF: Pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Chest Med* 25: 593 - 613, 2004.
- 6) Kitamura T, Tanaka N, Watanabe J, Uchida K, Kanegasaki S, Yamada Y and Nakata K: Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190: 875 - 880, 1999.
- 7) Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Seymour JF, Oh-eda M, Ishige I, Eishi Y, Kitamura T, Yamada Y, Hanaoka K and Keicho N: High-affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood* 103: 1089 - 1098, 2004.
- 8) Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA and Mulligan RC: Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264: 713 - 716, 1994.
- 9) Bonfield TL, Raychaudhuri B, Malur A, Abraham S, Trapnell BC, Kavuru MS and Thomassen MJ: PU.1 regulation of human alveolar macrophage

- differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1132 - L1136, 2003.
- 10) Tazawa R, Hamano E, Arai T, Ohta H, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K and Nukiwa T: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1142 - 1149, 2005.
  - 11) Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA and Trapnell BC: GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 15: 557 - 567, 2001.
  - 12) Hansen T and Corbet A: Lung Development and Function. H. William Taeusch, and Roberta A. Ballard. AVERY'S DISEASE OF THE NEW-BORN. 7th ed, WB Saunders, Philadelphia, pp541 - 551, 1998.
  - 13) Whitsett JA, Wert SE and Trapnell BC: Genetic disorders influencing lung formation and function at birth. *Hum Mol Genet* 13: R207 - R215, 2004.
  - 14) Rebello CM, Jobe AH, Eisele JW and Ikegami M: Alveolar and tissue surfactant pool sizes in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 625 - 628, 1996.
  - 15) Jobe A, Ikegami M and Jacobs H: Changes in the amount of lung and airway phosphatidylcholine in 0.5 - 12.5 - day - old rabbits. *Biochim. Biophys. Acta* 664: 182 - 187, 1981.
  - 16) Jacobs H, Jobe A, Ikegami M and Jones S: Surfactant phosphatidylcholine source, fluxes, and turnover times in 3 - day - old, 10 - day - old, and adult rabbits. *J Biol Chem* 257: 1805 - 1810, 1982.
  - 17) Ohashi T, Pinkerton K, Ikegami M and Jobe AH: Changes in alveolar surface area, surfactant protein A, and saturated phosphatidylcholine with postnatal rat lung growth. *Pediatr. Res* 35: 685 - 689, 1994.
  - 18) Eichbaum Q, Heney D, Raveh D, Chung M, Davidson M, Epstein J and Ezekowitz RAB: Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factor PU.1 and SP1. *Blood* 90: 4135 - 4143, 1997.
  - 19) Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W and Glass CK: Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7614 - 7619, 1998.
  - 20) Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D and Glass CK: Interleukin-4-dependent production of PPAR- $\gamma$  ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400: 378 - 382, 1999.
  - 21) Bonfield TL, Farver CF, Barna BP, Malur A, Abraham S, Raychaudhuri B, Kavuru MS and Thomassen MJ: Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is deficient in alveolar macrophages from patients with alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 29: 677 - 682, 2003.

(平成 17 年 12 月 26 日受付)