

でお示いただきましたが、この stroma cell のサイトカインの発現などは、他の骨髄から得られた stroma cell, たとえば, ST 2 などとどのような違いがあるのでしょうか。

宮路 骨髄から得られた stroma cell については今の時点では調べておりません。肝から得られた stroma cell に関しましては、細胞表面マーカーは class I 抗体である M1/42及び CD1d とも陽性です。それ以外の細胞表面マーカーや貪食能などは、今後調べていく予定です。

司会 どうぞ。

渡部 胸腺由来の stroma cell に関しましては、PCR 法によるサイトカインのメッセージは肝由来の細

胞とはほぼ同じでした。骨髄由来の stroma cell については現在検討中です。サイトカインのメッセージの有無では特異性は明確とはならないかもしれません。肝由来の stroma cell は CD1 抗原を強く表出しています。CD1 抗原は NKT 細胞の ligand と言われています。これが肝 stroma cell で発現されていることは、肝臓で NKT 細胞が分化する可能性を示唆しているのではないかと考えております。

司会 サイトカインと接触して成熟しますから、表面抗原と関係があるわけですね。それではどうもありがとうございました。それでは、3 番目の内藤先生お願いします。

3) マクロファージコロニー刺激因子欠損マウス (*op*) の 加齢による骨髄造血の変化

新潟大学医学部第 2 病理 内藤 眞・高塚 尚和・江部 祐輔
伊藤 重雄・梅津 哉

Bone Marrow Hematopoiesis in Aged Osteopetrosis (*op*) Mutant Mice
Defective in the Production of Macrophage Colony-stimulating Factor

Makoto NAITO, Hisakazu TAKATSUKA, Yusuke EBE
Shigeo ITO and Hajime UMEZU

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

Mice homozygous for the osteopetrosis (*op*) mutation are characterized by defective differentiation of osteoclasts, monocytes, and tissue macrophages due to a lack of functional macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) activity. In young (4-6 week-old) *op/op* mice, the bone marrow cavities were filled with spongy bone. In aged (50-72-week-old) *op/op* mice, the bone marrow cavities were markedly reconstructed and marrow hematopoiesis was expanded. Numbers of osteoclasts and bone

Reprint requests to: Makoto NAITO,
Second Department of Pathology,
Niigata University School of Medicine,
Niigata, 951-8510 JAPAN

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通 1 番町 757
新潟大学医学部第 2 病理 内藤 眞

marrow macrophages in aged *op/op* mice were increased but most of the osteoclasts were mononuclear cells and showed poorly developed ruffled borders. In contrast to the marked increase in numbers of osteoclasts and macrophages in the bone marrow, the number of Kupffer cells in the liver did not increase in aged *op/op* mice. M-CSF administration to aged *op/op* mice induced numerical increases in Kupffer cells and the development of ruffled border in osteoclasts. These findings indicate that M-CSF-independent mechanisms for bone marrow hematopoiesis and macrophage and osteoclast development function in aged *op/op* mice.

Key words: macrophages, macrophage colony-stimulating factor, osteoclasts, hematopoiesis, *op/op* mouse
マクロファージ, マクロファージコロニー刺激因子, 破骨細胞, 造血, *op/op* マウス

はじめに

骨髄造血においては種々のサイトカイン, 増殖因子が各種血球の分化, 増殖に重要な役割を果たしている. 造血系には多数のマクロファージが存在し, サイトカインの産生や接着分子を介してのシグナルの伝達によって造血を調節していると考えられる. さらに, 骨髄造血においては造血のスペースを確保するために, 骨を溶かす破骨細胞の役割も重要である. さらに, マクロファージや破骨細胞もサイトカインや増殖因子によって分化・増殖が制御される. このように, 造血, マクロファージと破骨細胞の分化とサイトカイン・増殖因子は密接な関係をもって相互作用している. マクロファージと破骨細胞は骨髄の前駆細胞に由来し^{1)~3)}, その分化には granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) や, macrophage colony stimulating factor (M-CSF/CSF-1), interleukin-3 (IL-3) などが関与する³⁾. その中でも M-CSF はマクロファージとその前駆細胞の分化・増殖・生存を効率的に調節する因子である⁴⁾⁵⁾. M-CSF 遺伝子の突然変異マウス (*op/op* マウス) は破骨細胞とマクロファージの分化異常によって大理石病を発症し^{6)~10)}, 単球¹⁰⁾や組織マクロファージ⁹⁾が少ない. 大理石病は破骨細胞がほとんどないことに起因する. 従って, *op/op* マウスへ M-CSF を投与すると破骨細胞とマクロファージは回復し, 骨病変も軽快・治癒する^{11)~17)}. このように M-CSF は破骨細胞やマクロファージの分化・増殖にきわめて重要な分子である.

一方, *op/op* マウスの大理石病は加齢によって軽減することが観察されている¹⁸⁾. このことは造血系は M-

CSF に依存しないシステムも有していることを示唆する. しかし, そのメカニズムは明らかにされていない. 本研究では1年以上飼育した *op/op* マウスを検索し, 骨髄造血および破骨細胞とマクロファージの分化を観察した. さらに M-CSF を投与して, 骨髄と組織マクロファージとを比較したので報告する.

1. 加齢による骨再構築と破骨細胞の分化

同腹マウスの正常な骨に比較して4~6週の若い *op/op* マウスでは頭蓋骨, 脊椎, 上腕骨, 前腕骨, 大腿骨, 脛骨, 尾骨など顕著な骨硬化を呈していた (Fig. 1a). 骨髄腔は狭く, 造血細胞はわずかであった. 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色では陽性細胞はきわめて少数であった. 50~72週令の *op/op* マウスでは骨皮質と骨梁が薄くなり, 骨髄腔の拡大と造血細胞の増加が見られた (Fig. 1b). この変化は長管骨に顕著であった. しかし, 体型などの変化はみられなかった. TRAP 陽性細胞は増加したが, その90%は小型の単核細胞であった. ベルリン青による鉄染色や PAS 染色では骨髄のマクロファージは正常水準に増加していた. 電顕的に老化 *op/op* マウスの破骨細胞には ruffled borders の発達は不良であった.

2. 肝組織マクロファージ (Kupffer 細胞) の変化

老若同腹マウスの Kupffer 細胞は肝類洞壁に多数存在した. しかし *op/op* マウスは若いマウスも老齢マウスも同腹マウスの 1/3 に減少していた. 電顕的にもライゾゾームや細胞突起の発達が不良であった (Fig. 2).

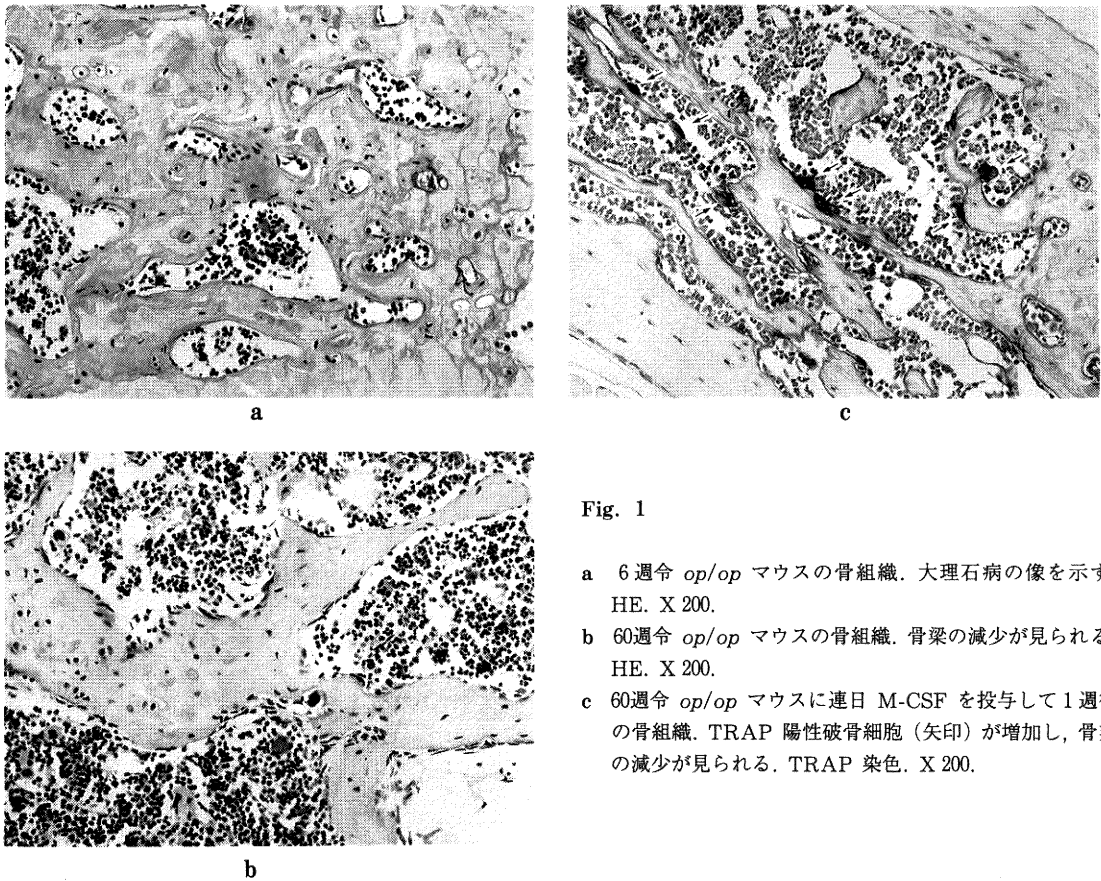


Fig. 1

- a 6週令 *op/op* マウスの骨組織. 大理石病の像を示す. HE. X 200.
 b 60週令 *op/op* マウスの骨組織. 骨梁の減少が見られる. HE. X 200.
 c 60週令 *op/op* マウスに連日 M-CSF を投与して1週後の骨組織. TRAP 陽性破骨細胞 (矢印) が増加し, 骨梁の減少が見られる. TRAP 染色. X 200.

3. M-CSF 投与による変化

老齢 *op/op* マウスに M-CSF を1週間連続投与すると骨髄のマクロファージに著変はなかったが, 破骨細胞は著しく増加し, 骨梁は減少した (Fig. 1c). TRAP 陽性細胞は多核細胞と単核細胞はほぼ同数であった. Kupffer 細胞数と形態は正常水準に回復した (Fig. 2). 骨髄マクロファージの電顕像は変化がなかったが, 破骨細胞は細胞内小器官や ruffled borders の発達が目立った.

4. *op/op* マウスの造血とマクロファージ分化機構

本研究で *op/op* マウスは加齢に骨構築と造血が回復することが明らかにされた. 加齢によって破骨細胞とマクロファージが増加し, マクロファージは成熟した形態を示した. しかし, TRAP 陽性細胞は小型, 単核で, いわゆる前破骨細胞と称される細胞であった. この細胞

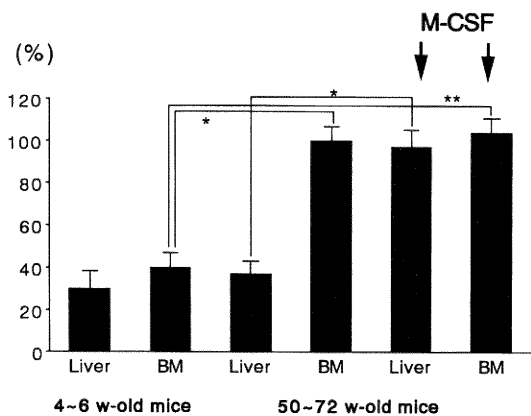


Fig. 2 老若 *op/op* マウスおよび M-CSF 1週間連日投与老齢 *op/op* マウスにおける骨髄マクロファージと肝の Kupffer 細胞数の変化.

は ruffled border の発達も不良であった。しかし、この単核細胞でも徐々に溶骨機能を發揮して骨量の減少を惹起するものと考えられる。これらの成績は老化 *op/op* マウスには M-CSF に依存しないマクロファージと破骨細胞の分化過程が存在することを意味している。一方、マクロファージの分化が骨髄に限定され、破骨細胞の分化は不完全であることも明らかにされた。

M-CSF の連続投与により破骨細胞と Kupffer 細胞の増加が認められ、破骨細胞の ruffled border の発達が誘導された。この所見は老化 *op/op* マウスでも組織マクロファージや破骨細胞は M-CSF 依存性の機構によって分化することを示している。すなわち、老化 *op/op* マウスでも M-CSF 依存性のマクロファージ、破骨細胞分化機構には変化はないものと考えられる。

それでは M-CSF に依存しないマクロファージの分化機構とは何であろうか。GM-CSF を短期間 *op/op* マウスに投与しても大理石病はなならないことが報告されている¹⁹⁾。しかしながら、GM-CSF, IL-3 などの増殖因子が老化 *op/op* マウスの骨変化や骨髄造血亢進の原因であることは否定できない。高橋らは老齢 *op/op* マウスの血清 GM-CSF が増加していることを見いだした(私信)。M-CSF は前破骨細胞の融合にも必須の物質であるため、GM-CSF は単核の前破骨細胞までの分化しか誘導できないが、長期にわたって徐々に骨融解を惹起することが推測される。このことは歯を溶かす同類の細胞である odontoblast の観察からも支持される²⁰⁾。一方、GM-CSF 依存性マクロファージは M-CSF 依存性マクロファージと機能的にも異なっていることが知られている。老化 *op/op* マウスの骨髄ではマクロファージが豊富で赤芽球島の形成が多数認められたが、GM-CSF 依存性マクロファージが赤芽球造血に関わる可能性も考慮されよう。

おわりに

op/op マウスの加齢による骨再構築、造血回復、マクロファージと破骨細胞の分化について報告した。老化 *op/op* マウスは M-CSF 依存性および非依存性のマクロファージ、破骨細胞、および造血機構の解析に有用なモデルになるものと考えられる。

謝辞

M-CSF の供与をいただきました森永乳業生物化学研究所に謝意を表します。なお、本研究の一部は文部省科学研究費、有任基金による研究助成および

朝日生命成人病研究助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Spector, W.G. and Langevoort, H.L.: The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **46**: 845~852, 1972.
- 2) Van Furth, R.: Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects, Part I. Mononuclear Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London. 1980.
- 3) Metcalf, D.: The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*, **339**: 27~30, 1989.
- 4) Metcalf, D. and Nicola, N.A.: The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: Enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations. *Blood*, **79**: 2861~2866, 1992.
- 5) Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M., Elliott, M., McArthur, G. and Li, M.: Synergistic suppression: Anomalous inhibition of the proliferation of factor-dependent hemopoietic cells by combination of two colony-stimulating factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 2819~2823, 1992.
- 6) 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.
- 7) Marks, S.C.: Morphological evidence of reduced bone resorption in osteopetrotic (*op*) mice. *Am. J. Anat.*, **163**: 157~167, 1982.
- 8) Marks, S.C. and Lane, P.W.: Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J. Hered.*, **67**: 11~18, 1976.
- 9) 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.

- 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) Cecchini, M.G., Dominguez, M.G., Mocci, S., Wetterwald, A., Felix, R., Fleisch, H., Chisholm, O., Hofstetter, W., Pollard, J.W. and Stanley, E.R.: 1994. 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.
 - 12) Felix, R., Cecchini, M.G. and Fleisch, H.: Macrophage colony stimulating factor restores *in vivo* bone resorption in the *op/op* osteopetrotic mouse. *Endocrinology*, **127**: 2592~2594, 1990.
 - 13) Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Nishida, S., Ohgame, Y., Abe, M., Kumagawa, 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.
 - 14) 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 osteoclast development and differentiation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **28**: 1~9, 1996.
 - 15) Umeda, S., Takahashi, K., Shultz, L.D., Naito, M. and Takagi, K.: Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on macrophages and related cell populations in osteopetrosis (*op*) mouse defective in production of functional M-CSF protein. *Am. J. Pathol.*, **149**: 559~574, 1996.
 - 16) 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. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **26**: 111~119, 1994.
 - 17) 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.
 - 18) Begg, S.K., Radley, J.M., Pollard, J.W., Chisholm, O.T., Stanley, E.R. and Bertoncello, I.: Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (*op/op*) mice. *J. Exp. Med.*, **177**: 237~242, 1993.
 - 19) Wiktor-Jedrzejczak, W., Urbanowska, E. and Sperl, M.: GM-CSF corrects macrophage deficiencies but not osteopetrosis in CSF-1 deficient *op/op* mouse. *Exp Hematol*, **20**: 769, 1992.
 - 20) Domon, T., Osanai, M., Yasuda, M., Seki, E., Takahashi S., Yamamoto, T. and Wakita M.: Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: The distribution of nuclei in human odontoclasts. *Anat. Rec.*, **249**: 449~457, 1997.
- 司会 ありがとうございます。ではただ今の演題に御質問はございますでしょうか。どうぞ。
- 渡部 先生の御発表で、M-CSF が機能的に欠損していても、GM-CSF がある程度サポートするのではないかとおっしゃいましたが、我々の肝由来の stroma cell においても、M-CSF のメッセージが見られない cell line がありました。しかし GM-CSF のメッセージはでていますので、M ϕ 系の cell line の可能性も否定できないのではないかと思います次第です。
- 内藤 これとは違うマウスの実験で、クッパー細胞を完全に除去した後の回復をみると、マクロファージの前駆細胞が我々の抗体で detect できる範囲で見ると一時的に増えて、それからクッパー細胞が回復してきます。先生のご覧になっている細胞と同じだとうれしいのですが、肝臓は造血臓器ですので、そういう分化もあるだろうと前から考えていました。もう少し調べたいと思います。
- 司会 内藤先生は年を取った *op* マウスの骨髄からも stroma cell を取り始めているのですか。
- 内藤 まだ取っていません。今十何匹いますので、先生方で取っていただければうれしいのですが。
- 司会 他にございませんか。内藤先生ありがとうございます。では、次の望月先生お願いします。