

- R., Nordin, B.E.C. and Marshall D.H.: Effect of age on calcium absorption., *Lancet*, **12**: 535~537, 1970.
- 11) Gallagher, J.C., Riggs, B.L., Eisman, J., Hamstra, A., Arnaud, S.B. and Deluca, H.F.: Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients., *J. Clin. Invest.*, **64**: 729~736, 1979.
- 12) DeLuca, H.F.: Osteoporosis and the metabolites of vitamin D., *Metabolism*, **39**: 3~9, 1990.
- 13) Slovik, D.M., Adams, J.S., Neer, R.M., Holick, M.F. and Potts Jr, J.T.: Deficient production of 1, 25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic patients., *N. Eng. J. Med.*, **305**: 372~374, 1981.
- 14) 深瀬正晃, 藤田拓男ほか: 高感度 PTH 測定法による健常者の血中 PTH 動態と各種疾患の病態解析., *日内分泌会誌*, **65**: 807~827, 1989.
- 司会 それではディスカッションをしたいと思います, どなたかご質問ございますでしょうか. それでは第二席の第二病理の内藤教授で, 大理石病のモデルマウス (*op/op*) を用いた破骨細胞の分化機序の検討, 宜しく願います.

## 2) 大理石病モデルマウス (*op/op*) を用いた破骨細胞の分化機序の検討

新潟大学医学部病理学第二講座

内 藤 眞

### Differentiation of Osteoclasts in Osteopetrotic (*op*) Mutant Mice Lacking Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF/CSF-1) Activity

Makoto NAITO

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

Ultrastructural and cytochemical features of osteoclasts of mice homozygous for the osteopetrosis (*op/op*) mutation were studied. The mutant mice are characterized by the prominent osteosclerosis and defective differentiation of osteoclasts, monocytes, and tissue macrophages due to a lack of functional macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1) activity. In *op/op* mice, osteoclasts were markedly reduced and showed poorly developed ruffled borders. Daily administration of M-CSF induced the development and ultrastructural differentiation of osteoclasts, followed by the resorption of bones. These results indicate that the differentiation and proliferation of osteoclasts are mediated by M-CSF.

Key words: osteoclasts, macrophages, osteopetrotic mice, M-CSF (CSF-1)

破骨細胞, マクロファージ, 大理石病マウス, マクロファージコロニー刺激因子

Reprint requests 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二講座

内 藤 眞

## はじめに

骨組織は骨形成と骨吸収の平衡の上に維持され、骨形成には骨芽細胞、骨吸収には破骨細胞が関与し、骨代謝は両細胞間およびこれら細胞と骨基質との相互関係において多面的な調節を受けている。破骨細胞は骨吸収、再構築に重要な役割を果たす多核巨細胞であり、電顕的には発達した ruffled border や水解酵素を含んだ空胞によって特徴づけられる。破骨細胞は van Furth によると単球系細胞に由来するマクロファージの一種とみなされ<sup>1)</sup>、この見解は多くの *in vitro* の成績から支持されているが、生体内における分化過程の詳細はなお明確にされていない。

*op/op* マウスは従来大理石病のモデルマウスとして知られ、破骨細胞の欠損による骨の吸収・改築障害、全身の骨硬化を呈する<sup>2)</sup>ことから、破骨細胞の *in vivo* の分化過程を解析する上できわめて有用な動物と考えられる。近年 *op/op* マウスの M-CSF 遺伝子の変異が発見された<sup>2)</sup>。また M-CSF 投与によって *op/op* マウスの骨病変が改善することも報告され<sup>4)5)</sup>、*op/op* マウスの破骨細胞の分化障害は M-CSF 活性の欠如に起因することが明らかにされてきた。このような研究成績を踏まえ、著者は *op/op* マウスの破骨細胞およびマクロファージの分化障害と M-CSF 投与後の破骨細胞の分化について検討を加えたので報告する。

## *op/op* マウスの遺伝子異常

これまでマウスでは4種類の大理石病モデルマウスの存在が知られている。これら突然変異マウスのうち *op/op* 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<sup>6)7)</sup>ことから、造血支持環境に内在する原因によって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ていた。Yoshida らは *op/op* マウスの遺伝子を検索したところ、M-CSF の cDNA の遺伝子塩基配列からみて 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て M-CSF の機能発現部分の蛋白が産生されないことを見出した。mRNA レベルで検索するとそのメッセージは発現しているが、M-CSF の機能は全く発現されない<sup>3)8)</sup>。

## *op/op* マウスの骨組織、破骨細胞および組織マクロファージ

*op/op* マウスの外見的特徴は小さな体格、丸い顔、

短い尾、切歯の欠損など、いずれも骨形成の異常に起因する。これらの表現型は生後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<sup>2)</sup>。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は見られない(図 1-a)。従って、造血細胞は極めて少ない。また歯の原器はあるがその発育は見られない。

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、しかも 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 (TRAP) 染色陽性細胞もきわめて少ない。

破骨細胞以外にも *op/op* マウスにおいては血液中の単球、腹腔および胸腔マクロファージが減少し<sup>9)</sup>、組織レベルでも種々の程度のマクロファージの減少が明らかにされている<sup>10)11)</sup>。われわれの免疫組織化学的検討では、*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すると肝臓のクッパー細胞は 1/3、脾マクロファージは 1/2、子宮のマクロファージは 1/10 に減少していた<sup>10)</sup>。これら組織のマクロファージは電顕的にライソゾームや細胞表面の突起が少なく、未熟な形態を呈する。マクロファージにはサイトカインへの依存性から種々の亜群の存在が知られており、M-CSF 活性完全欠損環境下で存在するこれらのマクロファージは M-CSF 非依存性マクロファージといえることができる。*op/op* マウス表皮のランゲルハンス細胞やリンパ組織の樹状細胞は正常マウスと同様の分布、形態を示すことから、これらの細胞群は代表的な M-CSF 非依存性マクロファージと考えられる<sup>12)</sup>。*op/op* マウスにおける GM-CSF 濃度は正常域にあることから、これら 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。

## M-CSF 投与後の *op/op* マウスの骨変化

*op/op* マウスに M-CSF を投与すると2日後から単核の大型細胞が骨に接して増加し、単核の TRAP 染色陽性細胞は M-CSF 投与後急激に増加して3日後に最大となり、多核の TRAP 陽性細胞(破骨細胞)はそれに遅れて5日目にピークを示した。骨梁は減少・消失し、骨髓腔の形成、造血細胞の増加が見られ、骨病変が改善し(図 1-b)<sup>4)5)13)</sup>、2週後にはほとんど正常構造を呈した。電顕的に単核細胞には ruffled border や原形質内空胞がほとんどなく(図 2-a)、多核細胞ではそれら

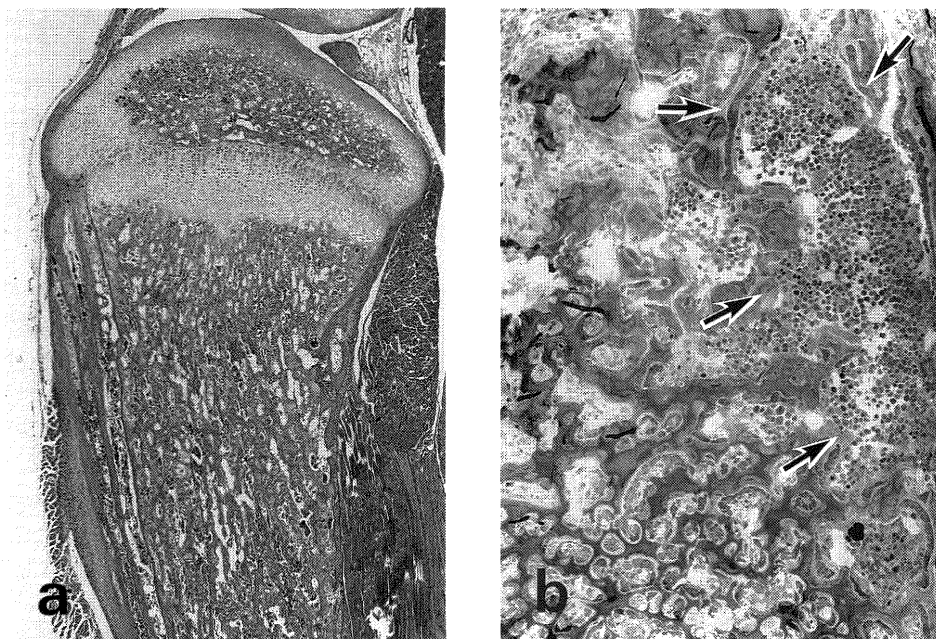


図1 a: *op/op* マウスの大腿骨. 骨梁が発達して著しい骨硬化を示し, 皮質と髄質の区別が不明である.  $\times 40$ . b: M-CSF 投与7日後の大腿骨. 骨吸収, 改築により, 骨髓腔の形成と造血細胞の増生 (矢印) がみられる.  $\times 200$ .

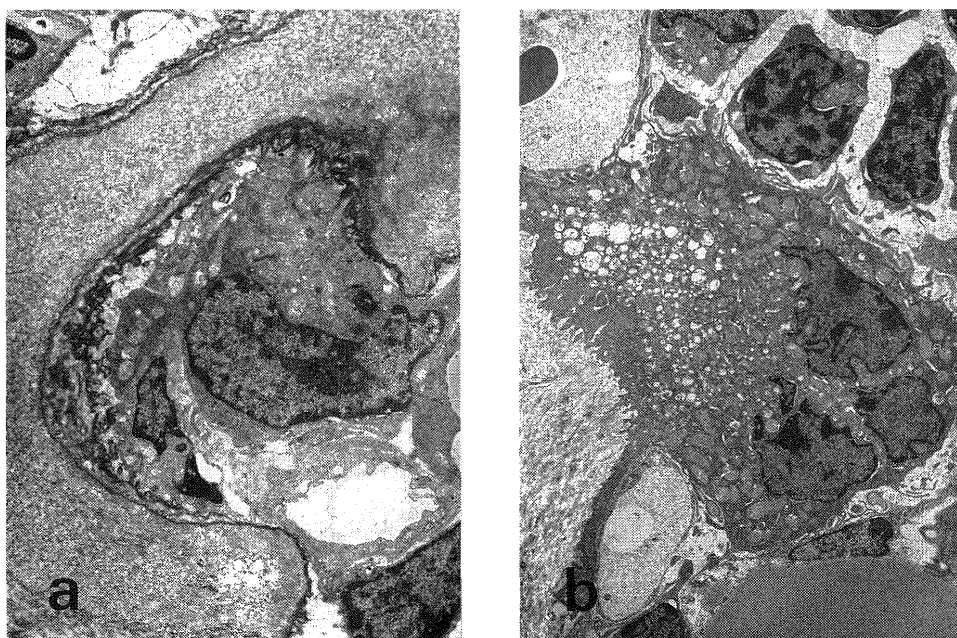


図2 a: M-CSF 投与2日目に出現する単核細胞. 骨基質に密着し, 骨吸収を窺わせるが, ruffled border は未発達.  $\times 2,000$ . b: M-CSF 投与3日以降に出現する破骨細胞. 骨に接した面に ruffled border の発達がみられ, 原形質内空胞も豊富である.  $\times 2,000$ .

の発達が見られた(図 2-b)。以上の事実から破骨細胞の分化には M-CSF が必須であることは明らかである。TRAP 染色とトリチウムサイミジンをを用いたオートラジオグラフィーを施行すると、単核、多核の TRAP 陽性細胞にトリチウムサイミジンの標識はほとんど認められなかった。このことは破骨細胞は分裂能を有さない細胞群であり、TRAP 陽性の単核細胞の融合によって多核の破骨細胞が形成されることを示唆している。なお、M-CSF 投与後 TRAP 陽性細胞の増加と末梢血中の単球の増加がほぼ同時期に観察された。このことから、単球と破骨細胞は M-CSF 依存性の細胞群とみなされる。

前述の様に van Furth によると破骨細胞は単球由来と規定される。一方、Tanaka らは破骨細胞の前駆細胞が4日間分裂増殖し、その後2日間で破骨細胞に分化することを脾細胞と造骨細胞の共培養実験で示している<sup>14)</sup>。この分化過程を in vivo にあてはめると、破骨細胞前駆細胞と単球は分裂能の有無の点から同一細胞ではありえないことになる。また今回の観察所見から破骨細胞の直接の前駆細胞は単核の TRAP 陽性細胞であり、これが単球から派生するか否かが問題となる。しかし、単球からマクロファージへの分化に要する日数を考慮すると、M-CSF 投与後単球と TRAP 陽性細胞がほぼ同時に急増する現象は説明が困難である。これらの成績を総合すると、M-CSF が CFU-M から前単球への分化過程のいずれかの段階に作用し、そこを分岐点として異なった分化経路を辿って単球系細胞と破骨細胞が分化誘導されるものと考えられる。

## おわりに

以上、M-CSF 活性欠損 *op/op* マウスを用いて破骨細胞の分化過程を検討した。破骨細胞は M-CSF 依存性マクロファージとみなされ、単球以前の分化段階の細胞から分化することが考慮された。今後 *op/op* マウスを用いた破骨細胞分化機構の解明を通して、骨粗鬆症を始めとする骨代謝疾患の研究の進展が期待される。

## 謝 辞

本研究は平成5年度有壬基金による新潟大学医学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.: Morphological evidence of reduced bone resorption in osteopetrotic (*op*) mice. Am. J. Anat., 163: 157~167, 1982.
- 3) 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.
- 4) Felix, R., Cecchini, M.G., Fleisch, H.: Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the *op/op* osteopetrotic mouse. Endocrinol., 127: 2592~2594, 1990.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) **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. Path.*, **139**: 657~667, 1991.
- 11) **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.
- 12) **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. Leukocyte Biol.*, **53**: 19~28, 1993.
- 13) **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.
- 14) **Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Tamura, T., Akatsu, T., Stanley, E.R., Kurokawa, T. and Suda, T.:** Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Invest.*, **91**: 257~263, 1993.

**司会** どうもありがとうございました。 *op/op* マウスを使って破骨細胞の由来を示して下さいましたが、どなたかご質問ございますでしょうか。このいろいろな薬剤を使って3日という時間を遅くしたり、早めたりということは可能なのでしょうか。

**内藤** それはまだやっておりません。ある種のリン化合物などの阻害剤を用いた実験などは、他のグループではやっておられるのですが、その阻害剤を用いますと破骨細胞の機能は阻害するのですが、破骨細胞の分化、増生は阻害しないということです。その阻害剤は成熟してちゃんと機能できる破骨細胞にしか対応しないから、その前の分化段階の細胞には余り影響がないという報告はあるのですが、その辺はやっておりません。

**司会** 破骨細胞が3日くらいで出現するそうですが、その現れ方は一番左の方で示されたレントゲンを見ますと、骨幹端から骨端にかけて硬化像がありましたが、骨芽細胞が現れますと、それが段々下がってくるわけですが、それは骨髓腔の方から段々吸収されるのでしょうか、それとも全体一緒に破骨細胞が現れて吸収されるのでしょうか。

**内藤** 長幹骨で観察いたしますと、長い骨の骨幹端に近い中央部分から、骨融解と破骨細胞の増生が観察されてくるというでき方かと思われます。

**司会** そうしますと、画面の一番左側のスライドのよりシャフトの方から吸収されていくということでしょうか。

**内藤** シャフトのまん中からではなくて、骨幹端の方からです。

**司会** そのほか、どなたかご質問はございますでしょうか。では3席は成長ホルモン療法における骨代謝の検討、小児科の菊池先生宜しく願い致します。