

マクロファージの発生分化機構と 動脈硬化発症機序における役割

新潟大学医学部病理学第二講座

内 藤 眞

Development and Differentiation of Macrophages and
the Role of Macrophages in Atherogenesis

Makoto NAITO

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

Macrophages are heterogenous populations existing in various tissues and organs, performing multifaceted functions in physiological and pathological conditions. In ontogeny, primitive/fetal macrophages first develop in yolk sac hematopoiesis without passing through the differentiation pathway of monocytic series. Monocytic cells are a minor cell population in the early fetal period, and increase in the late stage. Primitive/fetal macrophages proliferate and survive *in loco*. Tissue macrophages in adult animals also proliferate and maintain their population by self renewal. In monocytopenic mice induced by administration of bone-seeking isotope, strontium-89, tissue resident macrophages do not decrease. In macrophage colony stimulating factor (M-CSF)-deficient mice (*op/op*), monocytes as well as tissue macrophages are deficient. However, M-CSF-independent tissue macrophages and Langerhans/dendritic cells are present in the defective condition of monocyte differentiation into macrophages. These findings demonstrate that differentiation pathways of tissue macrophages and nonlymphoid dendritic cells are different from that of monocytes.

As an example of the specific functions of macrophages, tissue distribution, intracellular localization and expression of scavenger receptors were presented with special reference to the role of macrophages in endocytosis of chemically modified low density lipoprotein and atherogenesis.

Key words: monocytes, macrophages, ontogeny, osteopetrosis mouse (*op/op*), scavenger receptors

単球, マクロファージ, 個体発生, 大理石病モデルマウス (*op/op*), スカベンジャー
レセプター

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

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部病理学第二講座 内 藤 眞

緒 言

マクロファージは生体の各組織、臓器に分布し、食食、分解、処理、各種代謝機構に参画し、種々の生物活性物質の産生や分泌、免疫機構へ関与するなどその機能は多岐にわたる。マクロファージには形態的、機能的に異なった亜群が存在し、その発生分化機構の多様性が考慮されている。1世紀前 Metchnikoff によってマクロファージ¹⁾が観察されて以来 Aschoff による網内系²⁾、van Furth による単核食細胞系 (Mononuclear Phagocyte System: MPS)³⁾の提唱があり、マクロファージの起源と分化について幾多の論争が繰り広げられてきた。近年の血液学研究によれば、マクロファージは造血幹細胞に起源すると理解され、MPS によるマクロファージは骨髓造血に由来し、単芽球→前単球→単球の段階を経由して発生・分化する短命で、分裂能を失った終末細胞とみなされている。これに対して、マクロファージは自己再生によって生存可能な細胞群で、単球系細胞とは無関係であるという対立する見解も提示されている。本稿ではマクロファージの個体発生および *in vitro* におけるマクロファージの形態と分化過程、⁸⁹Strontium 投与単球減少マウスやマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 欠損マウス (*op/op*) でのマクロファージの分化を検討し、その発生、分化機序について解説する。さらにマクロファージの機能に関連して、スカベンジャーレセプター発現機構と動脈硬化症発症機序における役割についてこれまでの研究成果を概説する。

1. マクロファージの個体発生

マウス、ラットの個体発生における造血は卵黄嚢に初発し、卵黄嚢造血巣に大型で核小体の著明な核、貧弱な細胞質、未発達な Golgi 装置やライソゾームなどの原形質内小器官、豊富なポリゾーム、細長い原形質突起によって特徴づけられる原始マクロファージ (primitive macrophage) が出現し、原形質突起や小器官がより発達した胎生マクロファージ (fetal macrophage) へと分化する⁴⁾。卵黄嚢造血と肝造血初期には単球や顆粒球の発生以前に原始マクロファージが発生し、これは前単球や単球への分化過程を経由することなく胎生マクロファージに分化する⁵⁾⁶⁾。原始、胎生マクロファージは活発な増殖能を有し、胎生期の経過に伴って増加し⁷⁾⁸⁾、胎生後期に組織在住マクロファージへと分化する。典型的な単球系細胞は肝造血後半から増加する。

2. 胎生マクロファージの *in vitro* での分化

造血の発現と一致して卵黄嚢や肝原基に造血幹細胞 (CFU-S や CFU-C) が検出される。卵黄嚢・肝原基の血液細胞の培養では LP3-conditioned medium が単球・マクロファージコロニーの増生を選択的に誘導し、胎生造血巣に単球前駆細胞の存在が確認される⁵⁾⁶⁾。これに対してマウス骨髓由来の間質細胞株 ST2 を用いた胎生造血細胞の培養では単球・顆粒球コロニーのみならず、原始・胎生マクロファージコロニーの形成が誘導される⁵⁾⁶⁾。このように *in vitro* でも、胎児組織の観察所見と同様に胎生造血に2つのマクロファージ亜群、すなわち原始・胎生マクロファージと単球系マクロファージの存在が確認された。

3. マクロファージの増殖能

MPS 学説によれば、単球は組織でマクロファージに分化し、分裂能を欠如し、局所で短期間に死滅すると説明される³⁾。しかし、strontium-89 を投与して骨髓を選択的に照射し、ほとんど完全な単球減少症を惹起したマウスでは、単球の移入のない状態でも Kupffer 細胞の減少はなく、これは ³H サイミジンをを用いた検討から Kupffer 細胞の増殖能の亢進によることが証明された⁹⁾¹⁰⁾。本実験の成績をもとに算定すると、Kupffer 細胞は7～8週間に1度分裂すれば何ら単球の補給がなくとも維持可能である。胎生期のマクロファージのみならず生後の組織マクロファージも種々の条件下で分裂増殖によって維持される細胞群とみなされ、単球系マクロファージとは異なる細胞群とみなされる。

4. *op/op* マウスにおけるマクロファージの分化

大理石病モデルマウス (*op/op*) はマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 活性欠損動物であり¹¹⁾¹²⁾、破骨細胞の欠如のため骨改築が障害され、骨硬化が進行する。本マウスでは破骨細胞の分化障害に加えて、単球の激減¹³⁾¹⁴⁾、単球からマクロファージへの分化障害¹¹⁾¹⁵⁾、組織マクロファージの減少¹⁵⁾¹⁶⁾が明らかにされ、電顕的にも *op/op* マウスのマクロファージは食食像は目立つものの細胞内小器官は発達不良で、細胞表面の微絨毛も少数であった。このような未熟なマクロファージは M-CSF 非依存性マクロファージとみなされるが、胎生期に発現する原始・胎生マクロファージに近似した形態を示すことは興味深い。

同腹マウス (+/?) にグルカンを静注すると肝に異物型の肉芽腫が形成され、肉芽腫形成には単球由来のマクロファージと Kupffer 細胞が参画し、類上皮細胞、多核巨細胞への分化が観察される。op/op マウスのグルカン誘発肝肉芽腫形成実験では M-CSF 活性の完全欠損状態によって単球からマクロファージへの分化が見られないにもかかわらず、op/op マウスには同腹マウスに比較して少数ではあるが肉芽腫が形成される。単球は見られず、Kupffer 細胞の増殖と類上皮細胞、多核巨細胞への分化が観察され、これら分化機構には GM-CSF が関与しているものと考慮される¹⁹⁾。

op/op マウスの肺から樹立された線維芽細胞株を用いた正常骨髓細胞の培養では培養 2 週後でも 95% 以上が単球、顆粒球の状態で推移し、5% ほどが未熟なマクロファージで、これは M-CSF 非依存性マクロファージとみなされる¹¹⁾¹⁵⁾。さらにこの培養状態に M-CSF を添加するとすべての細胞が成熟した形態のマクロファージに分化する。

op/op マウスに M-CSF を投与すると単球の増加、破骨細胞の出現、骨病変の治癒、切歯の崩出が見られる¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。免疫組織化学的観察では、組織マクロファージ数は M-CSF 投与 2 週後同腹マウスのそれとほぼ同数の状態で回復し、分化成熟したマクロファージの超微形態を示すようになる。以上の *in vivo* および *in vitro* の成績から 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といえよう。

5. 樹状細胞の分化

マクロファージの類縁細胞である樹状細胞は抗原提示細胞として重要な役割を果たすが、最近 *in vitro* の研究成績からこの細胞系は GM-CSF によって分化誘導されることが強く示唆されている。op/op マウスの GM-CSF 活性は正常である¹²⁾ ので、樹状細胞の分化も正常であることが推測される。そこで op/op マウスの表皮内 Langerhans 細胞やリンパ組織の樹状細胞を観察すると、同腹マウスと同等に分布していた。以上の所見から樹状細胞は M-CSF による分化制御を受けず、GM-CSF によって分化誘導される細胞群であることが *in vivo* でも確認され、M-CSF によって分化する単球系細胞とは異なった細胞群とみなされる²⁰⁾。

6. マクロファージのスカベンジャーレセプター

動脈硬化の基本的病像は、動脈壁におけるコレステロー

ル蓄積と泡沫細胞の出現・集簇である。マクロファージ由来の泡沫細胞は動脈硬化初期病変で重要な役割を演ずる。スカベンジャーレセプターはマクロファージに特異的なレセプターで、生体内で化学修飾を受けた低密度リポ蛋白を認識し、その細胞内取り込みに関与する²¹⁾²²⁾。

ウシのマクロファージスカベンジャーレセプターに対するモノクロナル抗体を用いた免疫組織学的検索ではスカベンジャーレセプターは肺泡マクロファージ、肝の Kupffer 細胞、脳の毛細血管周囲マクロファージなど種々の組織のマクロファージに特異的に発現する²³⁾。ヒトの型特異的な抗体を用いた免疫組織学的検索ではヒトマクロファージに I 型、II 型のスカベンジャーレセプターの同時発現が認められ、動脈硬化病巣でも泡沫細胞に観察される²⁴⁾²⁵⁾。

スカベンジャーレセプターはマクロファージの細胞膜と、一部エンドゾームの膜に発現する。アセチル化低密度リポ蛋白 (acLDL) をスカベンジャーレセプターに結合させると、スカベンジャーレセプターは coated pit に集積し、速やかに小胞として細胞内に移入してエンドゾームを形成する。acLDL はライソゾームへ移行し、一方スカベンジャーレセプターは Golgi 装置を経由して細胞膜にリサイクルする。スカベンジャーレセプター発現ベクターを非マクロファージ系細胞の COS 細胞に移入すると、核周、粗面小胞体、Golgi 装置にレセプター活性が認められた。一方 HEL 細胞にこのベクターを移入し、マクロファージに分化させると、上記小器官に加えて細胞膜にスカベンジャーレセプター活性が発現する。このことからマクロファージにはスカベンジャーレセプターを粗面小胞体から細胞膜へ輸送する特異的な機構が存在することが示唆された²³⁾。

スカベンジャーレセプターの動脈硬化病巣での発現を見ると、動脈硬化初期像の線維性内膜肥厚病巣ではマクロファージは少数で、その一部にスカベンジャーレセプターが発現する。fatty streak での泡沫細胞はスカベンジャーレセプターが発現が多く、アテローム斑では泡沫細胞の減少、変性、消失に伴って減弱する²⁵⁾。動脈硬化病巣の泡沫細胞、平滑筋、内皮細胞には M-CSF と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) も検出され、M-CSF によるマクロファージのスカベンジャーレセプター発現の増強と MCP-1 による単球の動脈壁内侵入への誘導が示唆される^{26)~28)}。

以上の成績からマクロファージはスカベンジャーレセプターを介して変性 LDL を無制限に取り込み、動脈硬化病変進展の引金になると考えられる。

結 語

以上、マクロファージの個体発生、*in vitro* や *op/op* マウスにおける分化過程の解析、増殖能の検討、スカベンジャーレセプターの発現機構についてこれまでの研究成績を紹介した。

マクロファージには個体発生時すでに異なった亜群が存在し、生後も各組織で異なった役割を担うマクロファージ亜群を形成する。こういった heterogeneity は生理的、病的組織環境や分化・成熟段階におけるマクロファージのサイトカイン、増殖因子などのシグナルに対する反応性の違いを反映しているものと考えられる。今後これらマクロファージ亜群の相互関係、分化制御機構の問題について研究の進展が期待される。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導をいただきました福島県立医科大学小島瑞名誉教授、熊本大学医学部病理学第二講座高橋潔教授に深甚の謝意を表します。なお本研究は東京大学医学部第三内科児玉龍彦博士、大阪大学薬学部土井健史助教授、国立健康栄養研究所松本明世博士、熊本大学医学部形態発生西川伸一教授、林眞一博士、Jackson 研究所 L.D. Shultz 博士の御協力を得て行ったものであり、深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Metchnikoff, E.: Lecons sur la pathologie comparee de l'inflammation. Masson, Paris, 1892.
- 2) Aschoff, L.: Das reticulo-endotheliale System. *Ergeb. inn. Med. Kinderheilk.*, **26**: 1~118, 1924.
- 3) van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsh, J.G., Humphry, J.H., Spector, W.G. and Langevoort, H.L.: The mononuclear phagocyte system: A new classification of macrophages, monocytes, and their precursors. *Bull. WHO.*, **46**: 845~852, 1972.
- 4) 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. Leukocyte Biol.*, **45**: 87~96, 1989.
- 5) Naito, M., Yamamura, F., Nishikawa, S. and Takahashi, K.: Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures. *J. Leukocyte Biol.*, **46**: 1~10, 1989.
- 6) Naito, M., Takakashi, K. and Nishikawa, S-I: Development, differentiation and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *J. Leukocyte Biol.*, **48**: 27~37, 1990.
- 7) Takahashi, K., Naito, M., Katabuchi, H. and Higashi, K.: Development, differentiation, and maturation of macrophages in the chorionic villi of mouse placenta with special reference to the origin of Hoffbauer cells. *J. Leukocyte Biol.*, **50**: 57~68, 1991.
- 8) Higashi, K., Naito, M. and Takahashi, K.: Ontogenetic development, differentiation, and phenotypic expression of macrophages in fetal rat lungs. *J. Leukocyte Biol.*, **51**: 444~454, 1992.
- 9) 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. Leukocyte Biol.*, **47**: 195~205, 1990.
- 10) 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.*, **50**: 664~674, 1991.
- 11) Yoshida, H., Hayashi, S-I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H. and Shultz, L.D.: 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.
- 12) Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W.Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. and Pollard, T.W.: Total absence of colony-stimulating factor in the macrophage-deficient osteopetrotic (*op/op*) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 4828~4832, 1990.
- 13) Wiktor-Jedrzejczak, W., Ahmed, A., Szczylak, 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.
- 14) **Kodama, H., Yamasaki, A., Nose, M., Nishida, S., Ohgame, Y. and Abe, M.**: Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (*op/op*) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, **173**: 269~272, 1991.
- 15) **Naito, M., Hayashi, S., Yoshida, H., Nishikawa, S., Schultz, L. and Takahashi, K.**: Abnormal differentiation of tissue macrophage populations in "osteopetrosis" (*op*) mice defective in the production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) or CSF-1. *Amer. J. Pathol.*, **139**: 657~667, 1991.
- 16) **Felix, R., Cecchini, M.G., 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.
- 17) **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.
- 18) **Wiktor-Jedrzejczak, W., Urbanowska, E., Aukerman, S.L., Pollard, 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.
- 19) **Naito, M. and Takahashi, K.**: Macrophage differentiation distinct from the mononuclear phagocyte system (MPS) and glucan-induced granuloma formation in osteopetrosis (*op*) mice defective in the production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF/CSF-1). In "Lymphoreticular Cells", Eds. K. Takahashi and S-H, Kim, Lymphoreticular Cell Foundation (Kumamoto, Japan), p.29~44, 1992.
- 20) **Takahashi, K., Naito, M., Shultz, L.D., Hayashi, S. and Nishikawa, S.**: 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.
- 21) **Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrewsky, J., Matsudaira, P. and Kriegler, M.**: Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, **343**: 531~535, 1990.
- 22) **Rohrer, L., Freeman, M., Kodama, T., Penman, M. and Kriegler, M.**: Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*, **343**: 570~572, 1990.
- 23) **Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T. and Takahashi, K.**: Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine scavenger receptors. *Amer. J. Pathol.*, **139**: 1411~1423, 1991.
- 24) **Matsumoto, A., Naito, M., Itakura, H., Ikemoto, S., Asaoka, H., Hayakawa, I., Kanamori, H., Aburatani, H., Takaku, F., Suzuki, H., Kobari, Y., Miyai, T., Takahashi, K., Cohen, E.H., Wydro, R., Housman, D.E. and Kodama, T.**: Human macrophage scavenger receptors: Primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 9133~9137, 1990.
- 25) **Naito, M., Suzuki, H., Mori, T., Kodama, T., Matsumoto, A. and Takahashi, K.**: Coexpression of type I and II human macrophage scavenger receptors in macrophages in various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Amer. J. Pathol.*, **141**: 591~599, 1992.
- 26) **Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W. and Libby, P.**: Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.*, **140**: 301~316, 1992.
- 27) **Rosenfeld, M.E., Ylä-Herttuala, S., Lipton, B.A., Ord, V.A., Witztum, J.L. and Steinberg, D.**: Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am. J. Pathol.*, **140**: 291~300,

- 1992.
- 28) Ylä-Herttuala, S., Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E., Sarkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Witztum, J.L. and Steinberg, D.: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5252~5256, 1991.
-