

造血組織定住性マクロファージ：赤芽球および顆粒球造血への関与

定平 吉都

マウス造血組織（骨髄・脾臓）の定住性マクロファージは骨髄の前駆細胞に由来する細胞で、細網細胞、内皮細胞等の骨格構成細胞とは F4/80 抗原によって明瞭に区別される。他組織のマクロファージおよび培養によって得られるマクロファージとはフォルスマン糖脂質を発現する点が異なる。後期赤芽球前駆細胞 (CFU-e) はこのマクロファージに付着し、エリスロポエチンの下で増殖・分化する。このときマクロファージは赤芽球との接着によって形態変化を示し赤芽球を包むように胞体突起を伸ばす。その結果“赤芽球島”が形成される。一方顆粒球造血亢進時には、顆粒球クラスター形成細胞が付着し、“顆粒球島”が形成される場合もある。このように定住性マクロファージは、造血の後期段階において造血支持細胞としての役割を果たす。

(平成2年11月26日採用)

Resident Macrophages in Hematopoietic Tissues : Their Roles in Erythropoiesis and Granulopoiesis

Yoshito Sadahira

In mouse hematopoietic tissues (bone marrow and splenic red pulp), resident macrophages were clearly distinguished from framework-forming stromal cells, such as fibroblastic reticulum cells or endothelial cells, in the expression of F4/80 antigen. These macrophages also expressed Forssman glycosphingolipid, whereas monocytes and macrophages in other tissues did not. Late erythrocytic precursor cells attached to the macrophages, proliferated, and differentiated to erythroblasts under erythropoietin. At this time, the macrophages extended their cytoplasmic processes between the erythroblasts. These sequential events led to the formation of erythroblastic islands. Upon stimulation of granulopoiesis, some cluster-forming granulocytic cells attached to the macrophages and granulocytic islands were formed. These data suggest that the resident macrophages in the hematopoietic tissues play a supportive role in late-stage hematopoiesis. (Accepted on November 26, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16 (3・4) : 201-208, 1990

Key Words ① Macrophages ② Erythropoiesis ③ Granulopoiesis
④ Erythroblastic islands

はじめに

マクロファージの前駆細胞は骨髄（マウスの場合には骨髄と脾臓）で産生され、単球として末梢血を流れ、それぞれの組織へ到着・定着し、そこでマクロファージに成熟し機能することが知られている。¹⁾ 最近、組織定住性マクロファージには表面抗原や機能性物質の産生・分泌にそれぞれの組織によって著しい違いがあることが知られるようになった。²⁾ すなわちマクロファージは定着したそれぞれの組織の環境に適応・分化し、単にスカベンジャーとしての役割だけでな

く増殖刺激因子あるいは抑制因子を分泌し、組織固有の恒常性や再生等に深く関与していると予想されている。私たちは、造血環境を構成する造血組織定住性のマクロファージの役割について研究を進めてきた。ここではこの細胞に関する最新の研究成果を私達が得た知見を中心として述べる。

赤芽球系造血と定住性マクロファージ

造血組織（マウスの場合には骨髄と脾臓）において定住性マクロファージは造血細胞、特に赤芽球の間に長い胞体突起を伸ばして存在してい

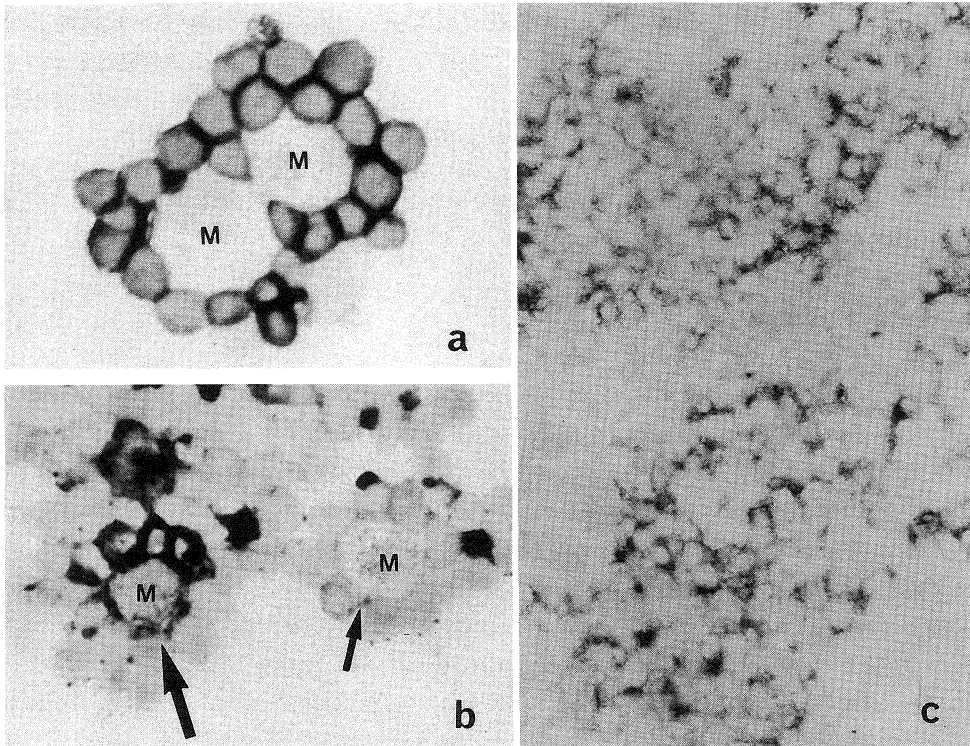


Fig. 1a. Immunostaining of an erythroblastic island isolated from mouse spleen with a monoclonal antibody against erythrocyte band 3 protein. M, central macrophage (Original magnification, $\times 500$).

b. Immunostaining of erythroblastic island with a monoclonal antibody against Forssman glycosphingolipid. M, central macrophage. A larger arrow shows a Forssman⁺ macrophage and a smaller arrow shows a Forssman⁻ macrophage (Original magnification, $\times 500$).

c. Immunostaining of a splenic section from an anemic mouse with anti-Forssman glycosphingolipid antiserum. A dendritic staining pattern of the cells outlying the erythroid colonies is evident in the red pulp (Original magnification, $\times 200$).

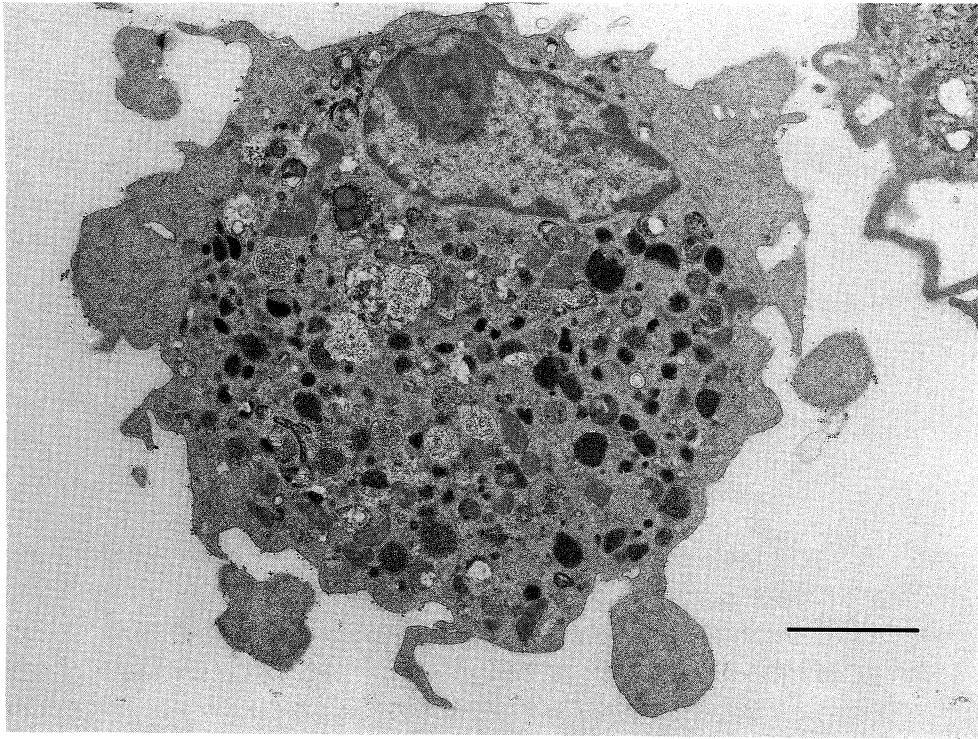


Fig. 2. Immunoelectron micrograph of splenic macrophages labeled with a monoclonal antibody against Forssman glycosphingolipid using an immunogold method. Bar, 2 μ m.

る (Figs. 1, 2).³⁾ この細胞はライソゾームが著しく発達し、障害をうけた赤芽球や赤芽球より放出される核の貧食を行うことが知られている。⁴⁾ また胞体内にはフェリチン、ヘモジデリンが多量に確認され、鉄の貯蔵細胞としての役割を果たすと考えられる。⁵⁾ これまで骨髓においては骨格構成細胞の一つである線維芽細胞様細胞と定住性マクロファージ (貧食性細胞様細胞とも呼ばれていた) の違いがあいまいであったが、Westen と Bainton らは線維芽細胞様細胞はアルカリフォスファターゼ陽性で主に顆粒球と密接しており、マクロファージは酸性フォスファターゼが陽性で主に赤芽球と密接していると報告し、線維芽細胞様細胞とマクロファージは異なる細胞集団であることを明確にした。⁶⁾ 最近になって Gordon らのグループは、マクロファージ特異抗原である F4/80 抗原がこのマクロファージには存在するが線維芽細胞様細胞には存在しないことを報告した。⁷⁻⁹⁾

中心にこのマクロファージが位置し、まわりを赤芽球が囲む構造は Besis らによって“赤芽球島”と名付けられた。⁵⁾ 彼らは、ヒトやラットの骨髓よりこの細胞複合体を機械的に分離し、in vitro に移すことによって両者が接着していることを明らかにした。¹⁰⁾ さらに造血細胞が健全であればマクロファージに接着していても貪食されないことを観察した。私達も脱血マウスの脾臓より赤芽球島を Figure 3 に示すようにコラギナーゼ消化法・動力沈降法・Percoll 比重分画法を組み合わせで分離した後、エリスロポエチン存在下にプラスチックシャーレ上で短期培養を試みた。¹¹⁾ 赤芽球島の中心性マクロファージはシャーレへの付着性が強く、分離直後では赤芽球を胞体突起で包んでいた。付着する赤芽球の60%はプロモデオキシウリジン (BrdU) を取り込み DNA 合成期に入っていたが、マクロファージは全くこれを取り込まなかった。また、マクロファージの中心に近い程大型の比較的未熟な赤芽

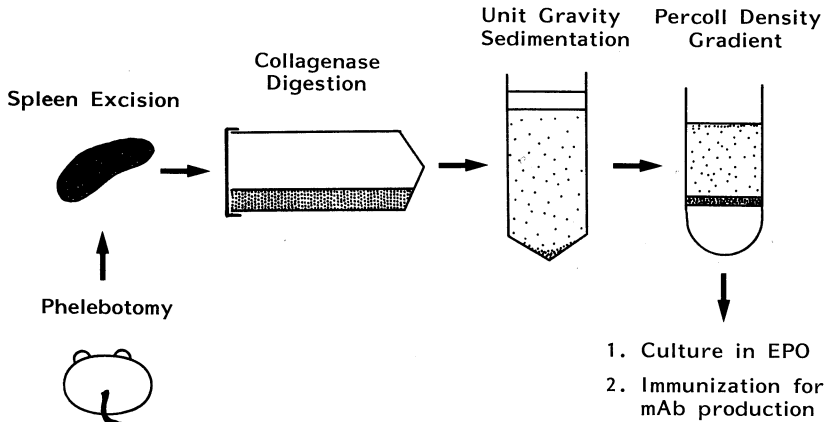


Fig. 3. A schematic illustration of method for isolation of splenic erythroblastic islands from anemic mice (Epo, erythropoietin).

球が位置し、周辺にいくほど、分化のすすんだ赤芽球が位置する傾向があった。脱核はマクロファージとの接着面とは反対側に向かっおこった。付着する赤芽球の多くは細胞膜バンド3蛋白陽性¹²⁾(形態的には好塩基性赤芽球・多染性赤芽球・正染性赤芽球および網状赤血球)であったが、これが陰性の未熟な前赤芽球も少数ながら認められた。一方、エリスロポエチン存在下で赤芽球島を培養した場合、いくつかの赤芽球島では培養36時間後にはマクロファージ上で新たにシンクロナイズした赤芽球の増殖・分化がみられた。エリスロポエチンを添加しない場合にはマクロファージ上での赤芽球の増殖・付着はみられず、24時間以内に赤芽球島は崩壊した。これらの結果はマクロファージにエリスロポエチン感受性のクラスター形成細胞(CFU-e)が付着し、エリスロポエチンが存在すればマクロファージに付着した状態で増殖・分化することを示している。

Morrisらは、胎児肝より分離した赤芽球島の中心性マクロファージと赤芽球との間の接着は、コラギナーゼ抵抗性・2価Cation依存性・トリプシン感受性であることを発見し、両者の接着に接着タンパクが介在することを予測している。¹³⁾またCrockerとGordonらはマウスの骨髓マクロファージにはヒツジ赤血球を付着する性質があり、これはマクロファージ上に存在するヒツ

ジ赤血球に対するレセプター(SER)タンパク質に依存していることをつきとめた。そしてSERは造血細胞との接着にも関与することを想定している。^{14),15)}興味深いことに、ヒツジ赤血球上のSERのリガンドはトリプシン抵抗性で末端がシアル酸-ガラクトースの糖鎖構造をもつガンダリオシドである可能性が示唆されている。

では、この造血細胞を付着する能力をもつマクロファージは生体内で赤芽球造血が変化した場合どんな動態を示すのであろうか。私たちはマウスの骨髓・赤脾髓の定住性マクロファージに、ヒツジ赤血球より分離したフォルスマン糖脂質(F)に対するウサギ抗血清が反応することを発見し、この抗体を用いた免疫組織化学的手法を使って、フォルスマン抗原陽性マクロファージ(F⁺マクロファージ)のin vivoでの動態を検討した。^{16),17)}まず赤芽球造血を脱血によって亢進させた場合には、脾臓には赤芽球造血巣が多数出現し、F⁺マクロファージはこの造血巣内ではすべてが細長い胞体突起を伸ばした。反対に輸血によって赤芽球造血を消失させた場合には、F⁺マクロファージは突起を退縮させ丸くなりマクロファージ同士が凝集した。さらに9.5Gyの放射線照射後に同系マウスの骨髓細胞を注入したマウスでは脾に赤芽球コロニーができたが、この場合F⁺マクロファージは造血細胞と異なり放射線抵抗性で、ドナー由来の造血コロニーが

拡大するにつれてコロニー内に包括されて胞体突起を伸ばした。しかしコロニー外では胞体は丸くなったままであった。これらの事実はF⁺マクロファージは動きが少ない細胞で、赤芽球の増殖によって拡大する造血巢内に赤芽球を結合しながら吸収されていくことを示している。

一方、フォルスマン糖脂質自身が赤芽球とマクロファージの間の結合に関与しているか否かを、分離したマウスの赤芽球島をラットに免疫することによって得た、フォルスマン糖脂質を認識するモノクローナル抗体(IgM, κ タイプ)¹²⁾を赤芽球島の短期培養系に添加することによって検討したが、陽性所見は得られなかった。

顆粒球・単球系造血と定住性マクロファージ

造血組織の培養では、もともと定住するマクロファージと、培養系に移した後に単球や顆粒球—単球系前駆細胞(CFU-GM)から分化してくる未熟なマクロファージの集団とが混在する。両者を区別することは従来のマーカーであるF4/80や酸性フォスファターゼを用いては不可能であった。しかしフォルスマン抗原は単球やCFU-GMに由来する未熟なマクロファージの集団には発現していないために、脾臓や骨髄の短期培養系に限ればこのマーカーによって定住性マクロファージを同定できた。^{16),18)}

脱血マウスの脾臓から得られた赤芽球島はマクロファージと赤芽球のみから成っている場合が多かったが、一部のものでは赤芽球とともに幼若な顆粒球・単球系細胞(ただしCFU-GM等の前駆細胞は除く)もマクロファージに付着していた。中心性マクロファージからはコロニー刺激因子(CSF)が分泌される¹¹⁾ので、これらはエリスロポエチン存在下の短期培養では赤芽球と混在してマクロファージ上で増殖し、赤芽球が網状赤血球に分化してしまうと、いわゆる“顆粒球島”が形成された。¹¹⁾また骨髄をDexterの長期培養系と同一条件で培養を開始した場合、一週間くらいまでは定住性マクロファージに由来する胞体の広い大型のF⁺マクロファージの上で数個から十数個の顆粒球—単球系細胞の

増殖がみられ、F⁻マクロファージには造血細胞は付着していなかった。¹⁸⁾

顆粒球と赤芽球の定住性マクロファージ(F⁺マクロファージ)への接着様式の差異を電顕を用いて観察したところ、赤芽球の場合には必ず付着部位の周囲よりマクロファージの胞体突起の伸長がみられたが、顆粒球や単球の場合にはマクロファージから胞体突起が伸びることはまれであった。これは定住性マクロファージと顆粒球との接着様式が、赤芽球との接着様式とは異なるものであることを示唆している。in vivoにおいてもエリスロポエチン濃度が低下しCSFの濃度が高まる場合には、顆粒球・単球系造血が亢進し未熟な顆粒球・単球系細胞の一部はマクロファージに付着した形で増殖、分化すると考えられる。

造血組織定住性マクロファージの異質性

分離したマウス脾臓の造血巢内マクロファージは骨髄マクロファージ同様すべてF4/80抗原陽性であった。しかしF4/80モノクローナル抗体とフォルスマン糖脂質に対するウサギ抗体を使って二重染色をした場合は、F4/80⁺F⁺のものとF4/80⁺F⁻のものに分けられた。¹⁷⁾このサブポピュレーションの存在を理解するために、胎生期の脾臓におけるフォルスマン抗原の発現を検討した。胎生期の脾臓では、造血はみられたがF⁺マクロファージは存在しておらず、生後より徐々に増加し3~4週後に成人マウスのレベルに達した。一方F4/80抗原は胎生期すでに存在しており生後も数を増した。この結果はフォルスマン抗原は造血組織内で一定の成熟期間を経たマクロファージに発現することを示唆しており、サブポピュレーションの存在はマクロファージの成熟度の相違を反映していると思われる。実際フォルスマン抗原陽性細胞は胎児期の肝臓には、赤芽球造血は盛んであっても存在しない(未発表データ)。Figure 4はこれまでの結果を図式化したものである。

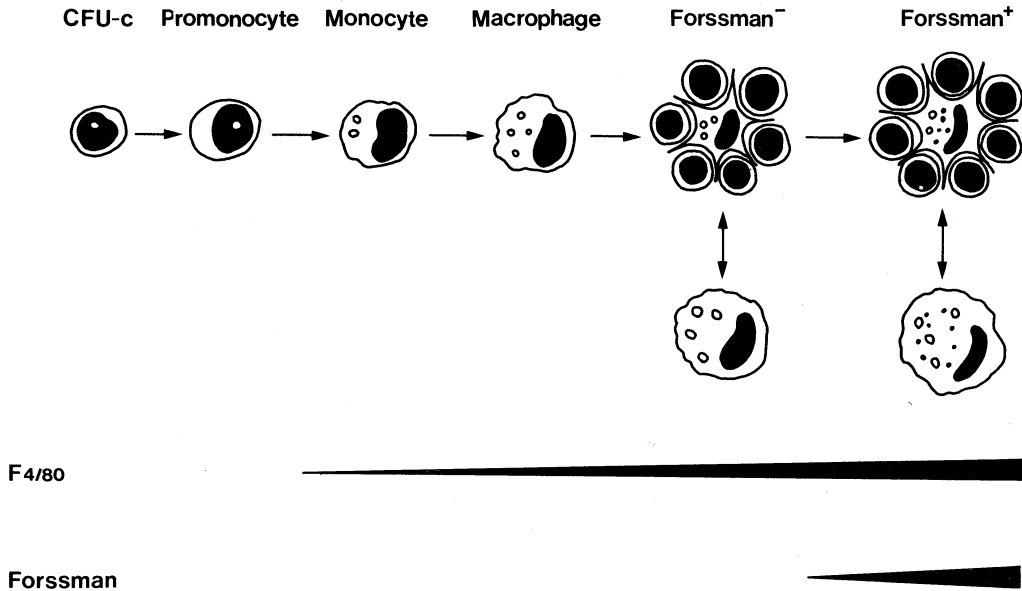


Fig. 4. A schematic summary of the expression of Forssman and F4/80 antigens during maturation of macrophages in mouse spleen

造血組織定住性マクロファージの起源と成熟

異種骨髄移植を施したマウスの脾臓を経時的に取り出し造血クライスター(主に赤芽球島)を分離した後、MHC class I 抗原に対するモノクローナル抗体を用いてこのクラスター内のマクロファージを免疫染色してその起源を調べることによって定住性マクロファージの成熟期間を推測した。その結果、骨髄移植後4週後まではドナーの造血細胞はほとんどがレシピエント由来のマクロファージに付着して増殖したが、5週後にはドナー由来のマクロファージが造血巣内に出現した。すなわち骨髄の前駆細胞から造血細胞を付着する機能をもつマクロファージに分化するまでには少なくとも5週を要することがわかった。このように造血細胞を付着するマクロファージは炎症巣に集簇するマクロファージと異なり、成熟にかなりの時間を必要とする。事実、造血組織に炎症が生じた場合に増加するマクロファージはMac-1抗原陽性、フォルスマン抗原陰性の形質を示し、骨髄細胞をCSF-Mの存在下で培養した場合に増殖してくるマクロファージの形質と類似している。¹⁹⁾

以上のことから定常状態におけるマクロファージの造血組織内での分化を説明するには、組織特異的なマクロファージの成熟促進因子を考える必要がある。これが液性因子なのか他の因子なのかは不明であるが、最近IL-4またはIL-6が腹腔マクロファージにフォルスマン抗原を発現させる作用があることが報告されており興味深い。²⁰⁾ 脾臓の造血環境因子の障害が認められているS1/S1^dマウスにおいては組織肥満細胞の成熟障害が報告されているが、²¹⁾ 脾臓のF⁺マクロファージは存在していた。したがって少なくともS1/S1^dに欠損している因子(C-kitに対するリガンド)は造血巣マクロファージへの分化に重大な影響は及ぼさないと考えられる。

おわりに

以上述べたように造血組織の定住性マクロファージは造血後期段階において、造血細胞の増殖・分化の足場を与えているが、どんなメカニズムで造血に関与しているかは現在もよくわかっていない。マクロファージの機能的多様性が明らかになった現在、腹腔マクロファージや骨髄細胞をCSF-M存在下に培養して得られるマ

クロファージ等を造血組織マクロファージの代用とする従来の研究方法が妥当とは言い難い、造血の場におけるマクロファージの機能を知るにはここで示したような造血組織の定住性マクロファージそのものを用いた実験がますます必要となってくると思われる。

この研究は文部省科学研究費補助金(No.62770252, 63770238, 01770246, 02770202) および川崎医科大学プロジェクト研究費(No.63-804, 1-509, 2-509)によって

行った。

研究を支えてくださいました川崎医科大学名誉教授 木本哲夫先生、岡山大学名誉教授 栗井通泰先生、そして御助言をいただきました同講師 森 将晏先生、同教授 保田立二先生に感謝いたします。またF4/80モノクローナル抗体を供与していただいたオックスフォード大学Simon Gordon博士、実験を補助して下さった平尾優子さん、原稿をタイプしていただいた秘書室 小野明子さんに感謝いたします。

文 献

- 1) van Furth, R. : Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiol.* 161 : 178—185, 1982
- 2) Gordon, S., Crocker, P. R., Morris, L., Lee, S. H., Perry, V. H. and Hume, D. A. : Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found. Symp.* 118 : 54—67, 1986
- 3) Weiss, L. : The hematopoietic microenvironment of the bone marrow : An ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat. Rec.* 186 : 161—184, 1976
- 4) Hudson, G. and Shortland, J. R. : Bone marrow macrophages. *In the reticuloendothelial system. Morphology*, vol. 1, ed. by Carr, I. and Daems, W.T. New York, Plenum. 1980, p. 329
- 5) Bessis, M. C. and Breton-Gorius, J. : Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy : A critical review. *Blood* 19 : 635—663, 1962
- 6) Westen, H. and Bainton, D. F. : Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. *J. Exp. Med.* 150 : 919—937, 1979
- 7) Austyn, J. M. and Gordon, S. : F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11 : 805—815, 1981
- 8) Hume, D. A., Robinson, A. P., Macpherson, G. G. and Gordon, S. : The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. *J. Exp. Med.* 158 : 1522—1536, 1983
- 9) Crocker, P. R. and Gordon, S. : Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 162 : 993—1014, 1985
- 10) Bessis, M., Mize, C. and Prenant, M. : Erythropoiesis : Comparison of in vivo and in vitro amplification. *Blood Cells* 4 : 155—168, 1978
- 11) Sadahira, Y., Mori, M. and Kimoto, T. : Isolation and short-term culture of mouse splenic erythroblastic islands. *Cell Struct. Funct.* 15 : 59—63, 1990
- 12) Sadahira, Y. and Kimoto, T. : Immunohistological identification of mouse erythroblastic islands by monoclonal antibodies against band 3 protein and Forssman glycosphingolipid. *J. Histochem. Cytochem.* 38 : 1042, 1990
- 13) Morris, L., Crocker, P. R. and Gordon, S. : Murine fetal liver macrophages bind developing erythroblasts by a divalent cation-dependent hemagglutinin. *J. Cell. Biol.* 106 : 649—656, 1988
- 14) Croker, P. R. and Gordon, S. : Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J. Exp. Med.* 164 : 1862—1875, 1986
- 15) Crocker, P. R. and Gordon, S. : Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with

- specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 169 : 1333—1346, 1989
- 16) Sadahira, Y., Mori, M., Awai, M., Watarai, S. and Yasuda, T. : Forssman glycosphingolipid as an immunohistochemical marker for mouse stromal macrophages in hematopoietic foci. *Blood* 72 : 42—48, 1988
 - 17) Sadahira, Y., Mori, M. and Kimoto, T. : Participation of radioresistant Forssman antigen-bearing macrophages in the formation of stromal elements of erythroid spleen colonies. *Br. J. Haematol.* 71 : 469—474, 1989
 - 18) Mori, M., Sadahira, Y., Kawasaki, S., Hayashi, T. and Awai, M. : Macrophage heterogeneity in bone marrow culture in vitro. *J. Cell Sci.* 95 : 481—485, 1990
 - 19) Sadahira, Y., Mori, M., Ozaki, M. and Awai, M. : Characteristics of histiocytic lesions in the reticuloendothelial system of NZB mice. *Acta Pathol. Jpn.* 37 : 1719—1729, 1987
 - 20) Kleist, R. V., Schmitt, E., Westermann, J. and Mühlrad, P. F. : Modulation of Forssman glycosphingolipid expression by murine macrophages : Coinduction with class II MHC antigen by the lymphokines IL4 and IL6. *Immunobiol.* 180 : 405—418, 1990
 - 21) Kitamura, Y. and Go, S. : Decreased production of mast cells in SI/SI^d mice. *Blood* 53 : 492—497, 1979