生体を構成する脂質による末梢マクロファージの増殖誘導

油井 聡, 山崎 正利

帝京大学薬学部薬品化学教室

Induction of peripheral macrophage growth by lipids which constitute tissue materials

Satoru Yui, Masatoshi Yamazaki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

(平成元年9月7日受付)
(平成元年9月19日受理)

It has been thought that peripheral macrophages do not usually proliferate and that the population of macrophages is maintained by influx of monocytes or immature mononuclear phagocytes originating from bone marrow. However, several authors reported that in some normal or pathological conditions, such as inflammations or tumors, local proliferation of peripheral macrophages was observed. Growth of macrophages is known to be induced by protein factors, such as colony stimulating factors (CSFs). On the other hand, we recently demonstrated that lipoproteins, dead cells or cell debris can also induce growth of mouse macrophages and we elucidated that their active components are lipids. The active lipid species are cholesterol (esters), triglycerides and several negatively charged phospholipids. We now consider that it is an important system regulating number of peripheral macrophages *in vivo* and that this lipid-induced macrophage growth may exist in from lower animals to mammals because scavenging dead cells or denatured lipoproteins is the most fundamental function of macrophages.

key words: peripheral macrophages, growth induction, lipids

はじめに

末梢組織に存在するマクロファージ(末梢Mφ)の起源としては、骨髄で産生され、血中の単球を経て末梢組織に遊走し、末梢Mφとなるものと、末梢局所における増殖によるものの二通りが考えられ

る。前者については、van Furthらにより確立されてきたが¹⁾、後者の局所での分裂の可能性も根強く主張されてきた²⁾。そればかりか、最近、腫瘍内部のMφ³⁾⁴⁾や炎症を起こした肺のMφ⁵⁾や肝臓のクッパー細胞⁶⁾が、局所で分裂増殖していることがみとめられたことや、通常状態においても肺⁷⁾や脾臓⁸⁾のM

ϕ の何割かが、局所で増殖した集団で占められることが見出され、末梢におけるM ϕ の増殖が、ますます重要であると考えられてきている⁹⁾。

これら末梢M ϕ の分裂が、*in vivo* で、どのように誘導され、調節されているかについては不明であるが、おそらく、M ϕ 増殖を誘導する因子が生体内に存在すると考えられる。*in vitro* において、末梢M ϕ の増殖を誘導する体内因子としては、コロニー刺激因子のグループに属するCSF-1 (M-CSF) が以前より知られ¹⁰⁾、さらに最近、GM-CSF¹¹⁾やIL-3¹²⁾もM ϕ 増殖を誘導したり、高めたりすることが報告された。これらはいずれも蛋白性で、微量でM ϕ 上の受容体と結合することにより作用を現すと考えられる。一方、われわれは、これらとは全く別に、炎症の場から*in vitro* でM ϕ 増殖を誘導する因子を見出すことを試みた。その結果、血漿リボ蛋白や細胞断片がM ϕ 増殖を誘導すること、さらに、それらを構成する通常の脂質が、M ϕ 増殖誘導活性を示すことを明らかにした^{13)~23)}。本総説では、われわれの見出した脂質によるM ϕ 増殖誘導に関する一連の研究について紹介する。

リボ蛋白のM ϕ 増殖誘導活性

われわれは新たな生体内M ϕ 増殖因子を探す目的で、まず第一に、炎症の一つのモデルであるマウスの癌性腹水に着目した。すなわち、末梢M ϕ として、C 3 H/Heあるいはdd Yマウスの腹腔にグリコゲン投与して得た腹腔誘導M ϕ を用い、5% FCSを含むRPI1640培地中で癌性腹水を添加して、その増殖を調べた。その結果、培地のみでは全くM ϕ の増殖は見られなかったが、癌性腹水を10%添加することで、M ϕ の増殖が認められた¹³⁾。

この癌性腹水中のM ϕ 増殖誘導因子の最初の性格付けとして、100℃の加熱処理により失活するかを調べたが(蛋白性のCSF-1はこの条件で失活する。)、予想に反して、この活性は、100℃処理で却って増強され、何か新しい因子の存在が期待された¹⁴⁾。そこで、さらに性格付けや部分精製を行った結果、癌性腹水中のM ϕ 増殖誘導因子は、一般の蛋白と異なり、リボ蛋白画分に回収されることを初めて明らかにした¹⁵⁾。

M ϕ は、日常、体内の変性した物質を貪食処理している細胞と考えられる。そこで、次にリボ蛋白を加熱変性させた後、M ϕ に加えたところ、リボ蛋白のM ϕ 増殖活性が顕著に増強された¹⁶⁾。このことか

ら、通常、血中や体液中のリボ蛋白は、M ϕ に認識される程度が低く、炎症などにより、変性した場合にM ϕ に効率よく貪食され、M ϕ の増殖を誘導することが考えられる。このことはアセチル化などの種々の条件で変性したリボ蛋白が、M ϕ に盛んに取り込まれるようになるという最近の知見²⁴⁾とも関連すると思われる。また、最近、動脈硬化の主成因として、M ϕ が過酸化などの変性を受けた低比重リボ蛋白(LDL)を貪食し、泡沫化することがあげられている²⁵⁾。われわれの捉えたリボ蛋白のM ϕ 増殖誘導という現象は、動脈硬化とも何らかの関わりを持つかもしれないと考えられる。

死細胞あるいは細胞断片のM ϕ 増殖誘導活性

M ϕ が、日常あるいは炎症などの病態において、貪食処理していると考えられる体内成分の代表として、自己の老化したり、損傷を受け、死んだ細胞があげられる。特に、炎症部位には、最初に多形核白血球(PMN)が侵入し、次いでM ϕ が遊走し、PMNは、それらM ϕ によって貪食除去されることが知られている。従って、そのようにM ϕ に貪食される自己の死細胞が、何らかの情報をM ϕ に伝えることも十分考えられる。そこで、マウスの死んだPMNを、*in vitro* でM ϕ の増殖系に加えてみた。その結果、初期にM ϕ がPMNを貪食する像が見られたが、その後、PMN数の減少とともに、次第にM ϕ の増殖が認められた(図1)¹⁷⁾。

次に、PMN以外に脾細胞や、MM46腫瘍細胞も同様に死細胞とし、M ϕ に加えたが、いずれもM ϕ 増殖を誘導した(図2)。従って、この現象は、ある特定の死細胞を貪食したときにだけ見られるものではなく、体内の色々な細胞に広く当てはまる現象であろうと考えられた。逆にいえば、色々な細胞に(おそらくリボ蛋白にも)共通に含まれる物質がM ϕ の増殖誘導の鍵を握っていることが予想された。尚、死細胞のM ϕ 増殖活性も100℃に安定であり、且つ、活性は細胞の可溶性画分ではなく不溶性画分に回収され、やはり従来のM ϕ 増殖因子とは異なるものであろうと思われた¹⁷⁾。

M ϕ 増殖誘導活性を示す脂質

リボ蛋白とあらゆる脂質に共通して含まれているのは脂質である。そこで、われわれは両者から脂質を抽出し、生理食塩水に超音波で懸濁後、M ϕ 増殖効果を調べた(図3)。その結果、いずれの脂質もM

図1 死んだPMNとともに培養したMφの経時変化

A) 2日後 B) 4日後 C) 6日後 D) 10日後。文献17より引用。

φの増殖を誘導した¹⁷⁾。ここでわれわれは、Mφが日常、食食処理している生体成分に含まれる脂質にMφ増殖活性があることを初めて明らかにすることが出来た。

この現象は、Mφがscavengeする体内物質に普遍的に含まれている物質＝脂質によって、Mφ自身が量的に増加するという、いわばMφのscavenge機能の増幅システムとして、炎症などの病態と関わっていると考えられる。また、炎症や腫瘍などで、リポ蛋白や死細胞がMφに激しく食食されるであろうことを考え合わせると、この現象は、それらで

報告されているMφの増殖をうまく説明出来る。尚、ラテックス粒子やカーボン粒子などの単なる食食物ではMφ増殖は起こらなかった。

脂質性の生体内メディエーターとして、アラキドン酸の代謝物や血小板活性化因子(PAF)などが知られているが、われわれは上記に示した性格上、Mφ増殖活性を示す脂質種は、通常、生体成分を構築しているものではないかと考え、市販の脂質を用いて活性脂質の種類を検討した。その結果、表1に示したように、コレステロール(エステル)、トリグリセリド、あるいは数種の酸性リン脂質といった基本

図2 死細胞のM ϕ 増殖誘導活性

PMN, 脾臓細胞, MM46腫瘍細胞を生理食塩中に懸濁し, 4℃で5日間放置して死細胞とした。グリコーゲンで誘導した腹腔M ϕ をそれら死細胞(○; PMN, △; 脾臓細胞, □: MM46)とともに培養した(●は無添加)。a) M ϕ の増殖曲線。b) 10日後における dose-response。文献17より引用。

的に生体を構築したり, リポ蛋白を構成する脂質種が活性を示すことが分かった。逆に, PAF やリゾリン脂質には活性が見られなかった¹⁸⁾。

リン脂質については, ホスファチジルセリン, カルジオリピン, ホスファチジルエタノールアミン等, 酸性~弱酸性の種類がM ϕ 増殖活性を示したが, 中性のホスファチジルコリン, スフィンゴミエリンは活性を示さなかった¹⁹⁾。これらの活性の有無は, 各リン脂質のM ϕ への結合性と相関することが分かった²⁰⁾。

脂質がM ϕ の増殖を誘導するメカニズムとして, 脂質が直接, M ϕ に作用するのではなく, 脂質がM ϕ から, CSFなどの増殖因子を放出させ, それがM ϕ の増殖をautocrine的に誘導している可能性が考えられる。しかし, 脂質をM ϕ に加えた培養上清中には, そのような活性は見出せなかった²¹⁾²²⁾, 脂質の活性はCSF-1に対する抗血清で阻害されなかった²²⁾ことから, 脂質はM ϕ の増殖を直接誘導していると考えられた。

脂質によって増殖したM ϕ の性質

どのようにして, コレステロール(エステル), ト

リグリセリド, リン脂質といった種類の異なる脂質が共通してM ϕ の増殖を誘導出来るのであろうか?この点は不明であるが, 第一段階として, われわれは, これらの脂質を添加して増殖したM ϕ に共通の性質があるかどうかを検討した。

まず, M ϕ にリン脂質を添加して培養したとき, それらリン脂質がM ϕ に取り込まれてから, どのように変化するかについて調べた。その結果, M ϕ 増殖誘導活性を有する酸性リン脂質は全て, M ϕ に効率良く取り込まれた後, トリグリセリドに変換されて蓄積していることが分かった(図4)。さらに, 蓄積したトリグリセリドは, 脂質球(lipid droplet)の形でM ϕ 中に存在し, いわゆる泡沫細胞の形態を示していた。反対に, 活性のないリン脂質(ホスファチジルコリン, スフィンゴミエリン)を添加した場合には, わずかししかトリグリセリドの蓄積がみられず, lipid droplet もあまりみられなかった²¹⁾。

一方, 他の活性脂質種であるコレステロール(エステル)やトリグリセリドを添加して培養したM ϕ も, それらの脂質をたくさん取り込んだ場合に, 細胞質内にlipid dropletとして蓄積することが知られている。従って, これら種々の脂質を加えて増殖

図3 リポ蛋白，細胞断片を加えて培養したMφの増殖

グリコーゲンで誘導した腹腔Mφをリポ蛋白，細胞断片○，あるいはそれらから抽出した脂質●とともに培養した。細胞数は10日後にカウントした。対照17より引用。

表1 脂質のMφ増殖誘導活性

脂質	種類	Mφ増殖活性の有無
コレステロール (エステル)	遊離コレステロール	+
	パルミチン酸エステル	+
	ステアリン酸エステル	+
	オレイン酸エステル	—
	リノール酸エステル	+
	リノレン酸エステル	+
トリグリセリド	トリパルミチン	+
	トリステアリン	+
	トリオレイン	—
	トリリノレイン	+
	トリリノレニン	+
遊離脂肪酸	パルミチン酸	—
	ステアリン酸	—
	オレイン酸	—
	リノール酸	—
	リノレン酸	—
リン脂質	ホスファチジルセリン	+
	ホスファチジルグリセロール	+
	ホスファチジルエタノールアミン	+
	ホスファチジン酸	+
	カルジオリピン	+
	ホスファチジルイノシトール	±
	ホスファチジルコリン	—
	スフィンゴミエリン	—

＋；有意にMφへの³H・チミジンの取り込みを増強させた脂質種。

—；Mφへの³H・チミジンの取り込みに影響しなかった脂質種。

図4 リン脂質とともに培養したMφの脂質含量の変化
グリコーゲンで誘導した腹腔Mφをホスファチジルセリン(○), ホスファチジルコリン(△)各々50μg/mlとともに培養した。(●は未処理)。a;遊離コレステロール含量。b;コレステロールエステル含量。c;トリグリセリド含量。文献21より引用。

したMφには加えた脂質の種類が異なっても, lipid dropletの蓄積という点で共通項があることが分かった。すなわち, この lipid dropletの蓄積は, Mφ増殖誘導のメカニズムの一つであるかもしれない。

また, 脂質によって分裂するMφは, すべて lipid dropletをぎっしり細胞質内に貯めこんだ形態を示しており(それ以上, 脂質濃度を上げるとMφが崩壊する), この分裂は過剰に取り込んだ脂質の蓄積を減らす方向に向けようとするMφの防御反応の一つであるということが出来る。

脂質とCSF-1のMφ増殖誘導活性の比較

脂質のMφ増殖活性やその性質を, 蛋白性因子であるCSF-1と比較検討した²²⁾。脂質の代表として, 活性の強いカルジオリピンを選んだ。カルジオリピンとCSF-1を添加したMφ増殖のtime-courseや

図5 系統発生からみたMφ増殖因子の仮想図

強さは大体同じであった。また, 両者に相乗効果は見られなかった。しかし, カルジオリピンとCSF-1の腹腔常在Mφ(レジデントMφ)の増殖に対する効果には著しい違いがあった。すなわち, Stanleyらにより報告されたように¹⁰⁾, CSF-1は腹腔誘導Mφの³H-チミジンの取り込みは増強させたが, レジデントMφの取り込みは増強させなかった。しかし, カルジオリピンは誘導Mφのみならず, レジデントMφにも作用しうることが分かった。よって, 脂質は炎症局所などに存在するレジデントMφの増殖を誘導する因子と考えることが出来る。

脂質の過酸化によるMφ増殖誘導活性の増強

先に, 変性リボ蛋白がMφ増殖活性を示すことを述べた。一方, 炎症や動脈硬化のみならず種々の疾患において, 局所のリボ蛋白や細胞膜の脂質の変性(過酸化)が起こることが知られている。従って, ここで, 脂質が過酸化を受けたとき, そのMφ増殖活性がどのように変化するかを検討することは重要であると考えられた。そこで, われわれはまず, 活性リン脂質の一つであるホスファチジルセリンを材料として検討を試みた²³⁾。

ホスファチジルセリンを空気中で紫外線照射することにより, 過酸化させたと, そのMφ増殖誘導活性は未処理に比べ, 顕著に増強された。この増強度は, 脂質の過酸化度と平行していた。この現象はホスファチジルエタノールアミンでもみられたが, もともと活性のないホスファチジルコリンでは, 過酸化させても活性はみられなかった。このことから, 種々の病態で生じた特定のリン脂質が過酸化すると, より効率よくMφの増殖が起こるシステム

が、生体に備わっていると考えられる。

お わ り に

以上、われわれは、CSFなどの蛋白性の因子ではなく、通常の生体構築脂質によるM ϕ 増殖誘導という新しい末梢M ϕ の増殖システムについて紹介してきた。これからの問題として、この現象が、*in vivo*のどのような場で見られるか検討することや、脂質の増殖誘導のメカニズムの解明など解決すべき大きな問題が残っている。しかし、最後に少し観点を变えて、系統発生の立場からこの現象を捉え直してみたい。

M ϕ という細胞は、日々生ずる死んだ自己の細胞の貪食処理という使命を負った細胞であるだけに、すべての多細胞動物に存在していると考えられている。脂質によるM ϕ 増殖誘導という現象は、まさに

この基本的で必須なM ϕ の役割と直接につながっており、従って、下等な動物においてもこの機構が備わっている可能性があると思われる。むしろわれわれは、脂質によるM ϕ 増殖誘導が、最も原始的なM ϕ の数の基本的な調節機構として、下等な動物からマウスという高等な動物まで保存されてきた重要なものであると考えている。そしてホ乳類では、CSFなどのホルモン様物質によって制御される進化したシステムがそれに共存しているのではなからうか(図5)。脂質がレジデントM ϕ の増殖を誘導するが、CSF-1は誘導しえないという前述の結果は、そのこととよく合うと思える。さらに最近、mammary epithelial cellの増殖を数種のリン脂質が、*in vitro*で誘導することが報告された²⁵⁾。このように、リン脂質が増殖活性を示すことは、M ϕ に限らず、より広くみられる現象であると思われる。

文

献

- 1) van Furth, R. van der Meer, J. M. Blusse van Oud Albas, A. and Sluiter, W.: Development of mononuclear phagocytes. In: Self-Defence Mechanisms-Role of Macrophages. (Cohn, Z. A. Mizuno, D. et al, eds.) University of Tokyo Press, Tokyo p.25-43 1982
- 2) Volkman, A.: Disparity in origin of mononuclear phagocyte populations. J. Reticuloendothel. Soc. 19: 249-268 1976
- 3) Stewart, C. C.: Local proliferation of mononuclear phagocytes in tumors. J. Reticuloendothel. Soc. 34: 23-27 1983
- 4) Evans, R. and Cullen, R. T.: In situ proliferation of intratumor macrophages. J. Leukocyte Biol. 35: 561-572 1984
- 5) Bitterman, P. B. Salzman, L. E. Adelberg, S. Ferrans, V. J. and Crystal, R. G.: Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. J. Lab. Invest. 74: 460-469 1984
- 6) Bowens, L. Knook, D. L. and Wisse, E.: Local proliferation and extrahepatic recruitment of liver macrophages (Kupffer cells) in partial-body irradiated rats. J. Leukocyte Biol. 39: 687-697 1986
- 7) van Furth, R. and Disselhoff-den Durk, M. M. C.: Dual origin of mouse spleen macrophages. J. Exp. Med. 160: 1273-1283 1984
- 8) Coggle, J. E., and Tarling, J. D.: The proliferation of pulmonary alveolar macrophages. J. Leukocyte Biol. 35: 317-327 1984
- 9) 内藤 眞, 高橋 潔, 山村文衛, 末吉信之: ラット胎生マクロファージの個体発生一肝造血を中心にして一マクロファージとその周辺(小島 瑞, 斉藤和久, 花岡正男編) 羊土社 東京 p. 11-29 1985
- 10) Stanley, E. R. Guilbert, L. J. Tushinski, R. J. and Bartelmets, S. H.: CSF-1- A mononuclear phagocyte lineage specific hemopoietic growth factor. J. Cell. Biochem. 21: 151-159 1983
- 11) Chen, B. D-M. Clark, C. R. and Chou, D. L.: Granulocyte/macrophage colony stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony stimulating factor. Blood 71: 997-1002 1988
- 12) Chen, B. D-M. Clark, C. R.: Interleukin 3 (IL 3) regulates the in vitro proliferation of both blood monocytes and peritoneal exudate macrophages: synergism between a macrophage lineage-specific colony-stimulating factor. J. Immunol. 137: 563-570 1986
- 13) Yamazaki, M. Ikenami, M. Yui, S. Esumi-kurusu, M. and Mizuno M.: Antitumor activity of macrophages grown in tumorous ascitic fluid. Gann 74: 155-161 1983

- 14) Yui, S. Mizuno, D. and Yamazaki, M.: Induction of macrophage growth by heat-stable factor in tumorous ascitic fluid. *Jpn. J. Exp. Med.* 54: 117-124 1984
- 15) Yui, S. Mizuno, D. and Yamazaki, M.: Induction of macrophage growth by lipoprotein. *Jpn. J. Exp. Med.* 54: 29-35 1985
- 16) Yui, S. Mizuno, D. and Yamazaki, M.: Induction of macrophage growth by the lipid moiety of lipoprotein and its augmentation by denaturation of the lipoproteins. *J. Leukocyte Biol.* 38: 697-707 1985
- 17) Yui, S. and Yamazaki, M.: Induction of macrophage growth by effete cells. *J. Leukocyte Biol.* 39: 489-497 1985
- 18) Yui, S. and Yamazaki, M.: Induction of macrophage growth by lipids. *J. Immunol.* 136: 1334-1338 1986
- 19) Yui, S. and Yamazaki, M.: Induction of macrophage growth by negatively charged phospholipids. *J. Leukocyte Biol.* 39: 713-716 1986
- 20) Yui, S. and Yamazaki, M.: Relationship of ability of phospholipids to stimulate growth and bind to macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 41: 392-399 1987
- 21) Yui, S. and Yamazaki, M.: Neutral lipid accumulation in macrophages during lipid-induced macrophage growth. *J. Leukocyte Biol.* 45: 189-197 1989
- 22) Yui, S. and Yamazaki, M.: Comparative studies on lipids and colony stimulating factor-1 induced macrophage growth. *J. Immunol.* in press. 1990
- 23) Yui, S. and Yamazaki, M.: Augmentation of macrophage growth-stimulating activity of lipids by their peroxidation. *J. Immunol.* in press. 1990
- 24) 北 徹: マクロファージの泡沫化機構 *生化学* 60: 1163-1168 1988
- 25) Steinbrecher, U. P. Parthasarathy, S. Leake, D. S. Witzum, J. L. and Steinberg, D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3883-3887 1984
- 26) Imagawa, W. Bandyopadhyay, G. K. Wallace, D. and Nandi, S.: Phospholipids containing polyunsaturated fatty acyl groups are mitogenic for normal mouse mammary epithelial cells in serum-free primary cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4122-4126 1989