

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 11 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20317

研究課題名(和文) 単球・マクロファージ系細胞の継代培養法の確立と創傷治癒関連機能の解析

研究課題名(英文) Passage culture of monocyte-macrophage lineage cells

研究代表者

菅 浩隆 (SUGA, Hirotaka)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60633972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：温度応答性ポリマーをコーティングしたディッシュを用いてヒト末梢血から採取した単核球分画を培養することにより、単球・マクロファージ系細胞の継代培養が可能となった。マクロファージコロニー刺激因子を添加することにより、細胞の増殖能が著明に増加した。継代を重ねるにつれて、単球・マクロファージ系細胞(CD11b陽性、CD14陽性)の割合が増え、第3継代目にはほぼ全ての細胞が単球・マクロファージ系細胞となっていた。培養した単球・マクロファージ系細胞は、組織マクロファージのマーカーであるCD206を発現していること、TNF-alphaやMCP-1など様々なサイトカインを分泌していることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We established a passage culture of monocyte-macrophage lineage cells using a temperature-responsive cell culture dish. Macrophage colony-stimulating factor increased proliferation of the cells during the passage culture. The rate of monocyte-macrophage lineage cells (CD11b+/CD14+) increased by passages, and the cells were mostly purified by three passages. The cultured monocyte-macrophage lineage cells were positive for CD206, a marker of tissue-resident macrophages, and secreted various cytokines such as TNF-alpha and MCP-1.

研究分野：創傷治癒

キーワード：単球・マクロファージ系細胞 継代培養 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、単球・マクロファージ系細胞が創傷治癒に大きく関与していることが知られるようになり、創傷治癒分野での基礎研究に単球・マクロファージ系細胞を使用する機会が増えている。しかし、培養した単球・マクロファージ系細胞はディッシュから剥がれにくいいため、継代して多くの細胞数を得ることや表面マーカーを経時的に解析することは困難であった。

2. 研究の目的

単球・マクロファージ系細胞の継代培養法を確立することを目的とした。

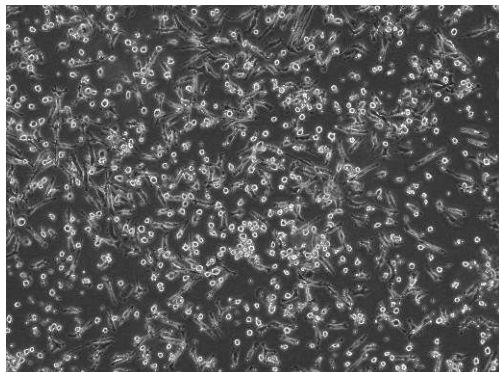
3. 研究の方法

3.2 を境に可逆的に疎水性となる温度応答性ポリマーをコーティングした特殊なディッシュ(商品名 RepCell、CellSeed 社製)を用いて、ヒト末梢血から採取した単核球分画を培養することにより、単球・マクロファージ系細胞の継代培養を試みた。その際に各種サイトカインを添加し、増殖への影響を評価した。また、各継代において、フローサイトメトリーによる表面マーカーの解析や、サイトカインアレイによるサイトカイン分泌の評価も行った。

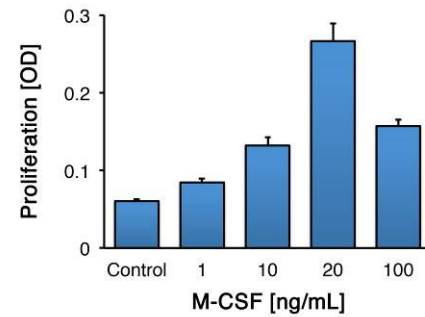
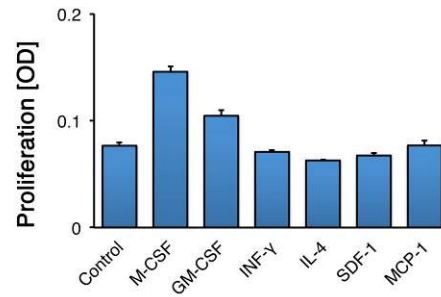
4. 研究成果

(1) 継代培養の確立

ディッシュを室温に30分間置くことにより、培養した細胞はディッシュから容易に剥がれ、継代が可能となった(下図)。

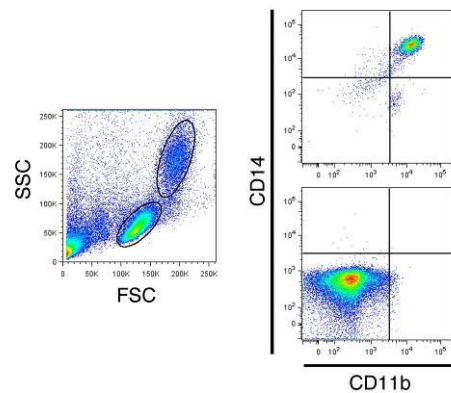


また、マクロファージコロニー刺激因子(以下 M-CSF)を添加することにより、細胞の増殖能が著明に増加した(下図)。

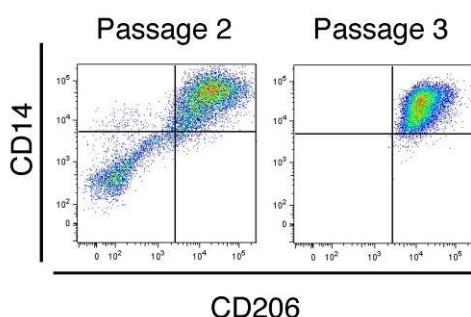
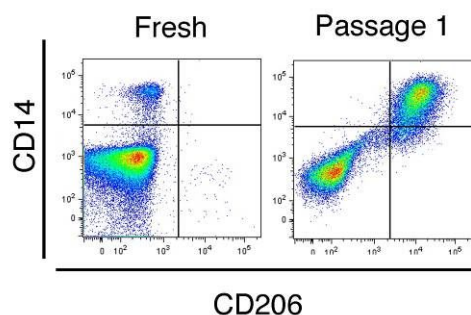
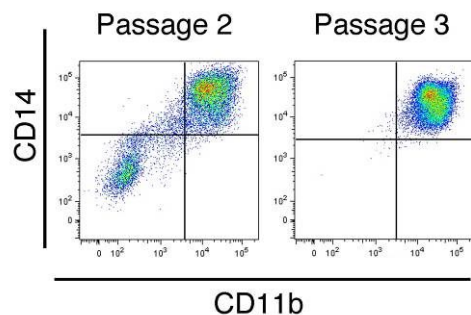
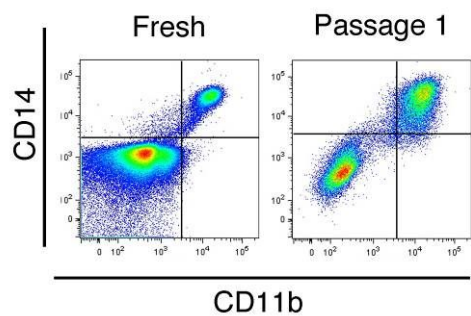


(2) フローサイトメトリーによる解析

末梢血から採取した単核球分画はリンパ球と単球・マクロファージ系細胞からなる細胞集団である。単球・マクロファージ系細胞は CD11b 陽性、CD14 陽性の細胞として区別されるが、末梢血中ではその割合は数%であった(下図)。

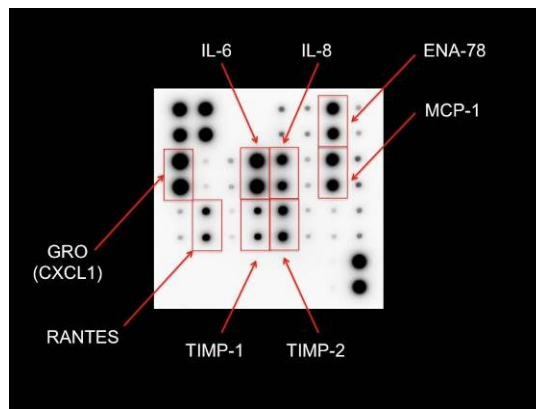


継代を重ねるにつれて、単球・マクロファージ系細胞（CD11b 陽性、CD14 陽性）の割合が徐々に増え、第3継代目にはほぼ全ての細胞が単球・マクロファージ系細胞となった。また、組織マクロファージのマーカーであるCD206は末梢血ではほとんど発現されていなかったが、培養の開始に伴い発現が見られるようになり、継代後もその発現は維持されていた（下図）。



(3) サイトカイン分泌

サイトカインアレイでは、培養した単球・マクロファージ系細胞が TNF-alpha や MCP-1 など様々なサイトカインを分泌していることが明らかとなった（下図）。



今回確立した継代培養法により、単球・マクロファージ系細胞の取扱いが容易となり、単球・マクロファージ系細胞に着目した創傷治癒研究がより発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕(計1件)

菅浩隆、栗田恵里奈、栗田昌和、江藤ひとみ、多久嶋亮彦、波利井清紀、末梢血から採取した単球・マクロファージ系細胞の効率的培養法、第24回日本形成外科学会基礎学術集会、2015年10月9日、盛岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅 浩隆 (SUGA, Hirotaka)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：60633972

(2) 研究協力者

栗田 恵里奈 (KURITA, Erina)
杏林大学・医学部・専攻医

塩田紀子 (SHIOTA, Noriko)
杏林大学・医学部・実験助手