

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861699

研究課題名(和文) 創傷治癒過程における単球・マクロファージ系細胞と線維芽細胞との相互作用の解明

研究課題名(英文) Interaction between monocyte/macrophage lineage cells and fibroblasts in the process of wound healing

研究代表者

菅 浩隆 (SUGA, Hirotaka)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60633972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒過程における単球・マクロファージ系細胞の相互作用を調べるため、両細胞の共培養系を確立した。ヒト末梢血より採取した単核球分画を温度応答性ディッシュを用いて継代培養することにより、CD11b陽性、CD14陽性の単球・マクロファージ系細胞を純化できた。共培養下では、線維芽細胞の増殖は促進されていた。また、共培養下では、線維芽細胞の1型コラーゲン、TGFbeta1などの発現は抑制される一方、MMP1の発現は促進されていた。創傷治癒過程では、単球・マクロファージ系細胞の分泌する液性因子により、線維芽細胞の増殖は促進されるものの、線維化そのものはむしろ抑制されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of monocyte/macrophage lineage cells on proliferation and gene expression of fibroblasts were examined in the co-culture system. Monocyte/macrophage lineage cells were purified after passaged culture of mononuclear cells from peripheral blood using temperature-responsive culture dish. Co-culture with monocyte/macrophage lineage cells enhanced proliferation of fibroblasts. Under co-culture, expression of type 1 collagen and transforming growth factor beta 1 was down-regulated in fibroblasts, while expression of matrix metalloproteinase 1 was up-regulated. Similar results were obtained when culture supernatant of monocyte/macrophage lineage cells was added to fibroblasts. It was suggested that, in the process of wound healing, monocyte/macrophage lineage cells enhance proliferation of fibroblasts and have anti-fibrotic effects on fibroblasts via humoral factors.

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 線維芽細胞 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒過程においては炎症細胞、線維芽細胞、表皮細胞など様々な細胞が関与しているが (Gurtner et al, Nature, 453: 314-321, 2008) これまでの創傷治癒の研究は主に線維芽細胞や表皮細胞に着目した研究が多く、創傷治癒における炎症細胞の役割そのものに不明な点が多かった。近年、創傷治癒に関与する炎症細胞の中で単球・マクロファージ系細胞が血管新生を促進し、創傷治癒において重要な役割を果たしていることが示されてきた (Okuno et al, Blood, 117: 5264-5272, 2011)。また、これまで fibrocyte と呼ばれてきた細胞 (血液由来細胞であるにもかかわらずコラーゲン産生能を持ち、線維化に関与するとされる細胞) も、その正体は単球・マクロファージ系細胞であることが確実視されている (Reilkoff et al, Nat Rev Immunol, 11: 427-435, 2011)。このように、創傷治癒の分野において、単球・マクロファージ系細胞に注目が集まっているが、この細胞についてはまだ不明な点も多く、特に、線維芽細胞をはじめとする他の細胞との相互作用についてはほとんど研究が行われていないのが現状であった。

2. 研究の目的

線維芽細胞は皮膚手術検体から、単球・マクロファージ系細胞はヒト末梢血から採取、培養し、それぞれの細胞を独立したチャンバーに播種して共通の培地で培養する、いわゆる独立型共培養のアッセイ系を確立する。そのうえで線維芽細胞の機能 (増殖、遺伝子発現、遊走能など) が、単球・マクロファージ系細胞の有無によってどのように変化するかを調べる。

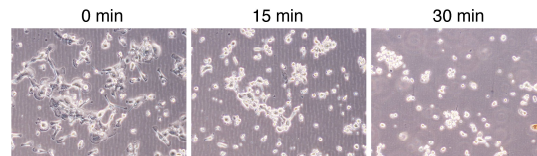
3. 研究の方法

倫理委員会による承認を得た後、ヒト末梢血から単核球分画を分離して接着培養を行うことにより、単球・マクロファージ系細胞を採取した。また、皮膚手術検体からエクスプラント法により線維芽細胞を培養、採取した。続いて、2層構造からなる特殊なプレート (セルカルチャーインサート、BD社) を用いて、単球・マクロファージ系細胞は上層で、線維芽細胞は下層で、共通の培地のもとでそれぞれ独立して培養する独立型共培養のアッセイ系を確立した。この実験系を用いて、単球・マクロファージ系細胞が存在することにより、線維芽細胞の増殖や遺伝子発現にどのような影響が及ぼされるのかを、増殖実験やリアルタイム PCR により検討した。また、単球・マクロファージ系細胞の培養上清を線維芽細胞に加えることによる影響も同様に検討した。

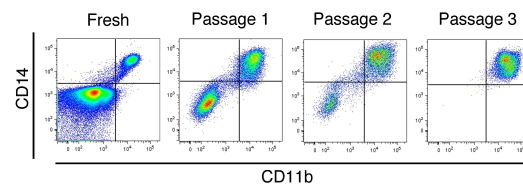
4. 研究成果

(1) 単球・マクロファージ系細胞の培養

ヒト末梢血から単核球分画を分離し、ディッシュに播種して培養すると、接着細胞が徐々に増殖した。継代に際しては、通常のディッシュではトリプシンを使用しても接着した細胞が剥がれず、継代を行うことが困難であった。温度応答性ディッシュ (RepCell、セルシード社) を用い、ディッシュを30分間室温に放置すると、接着した細胞が容易に剥離し、継代が可能となった (下図)。

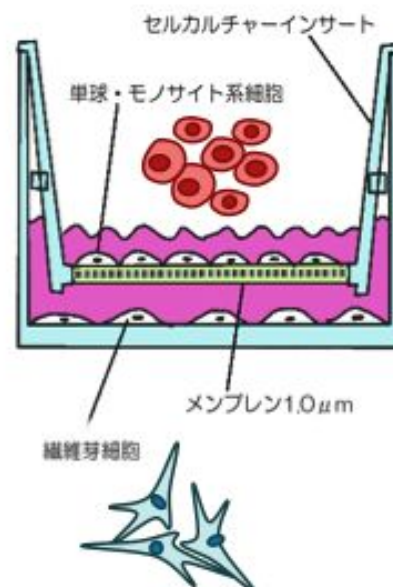


また、フローサイトメトリーの結果から、継代を重ねるたびに単球・マクロファージ系細胞 (CD11b 陽性、CD14 陽性) の割合が増加し、純化していくことも明らかとなった (下図)。

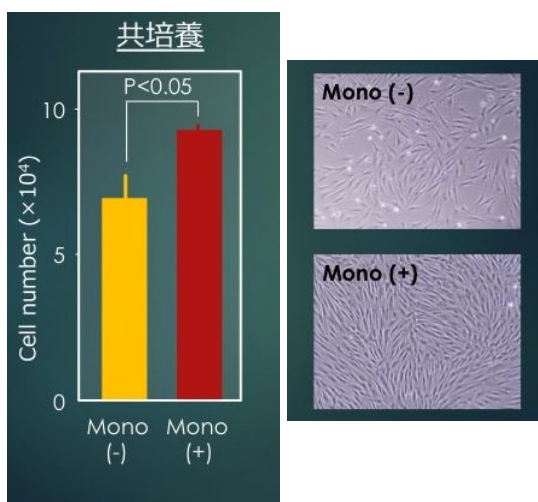


(2) 共培養の確立

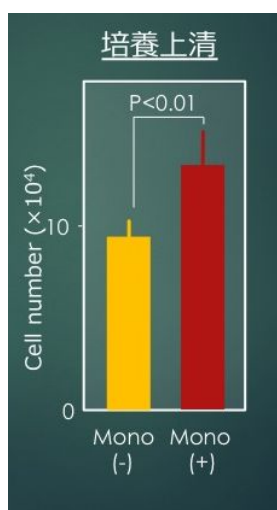
2層構造からなる特殊なプレート (セルカルチャーインサート、BD社) を用いて、単球・マクロファージ系細胞は上層で、線維芽細胞は下層で、共通の培地のもとでそれぞれ独立して培養する独立型共培養のアッセイ系を確立した (下図)。



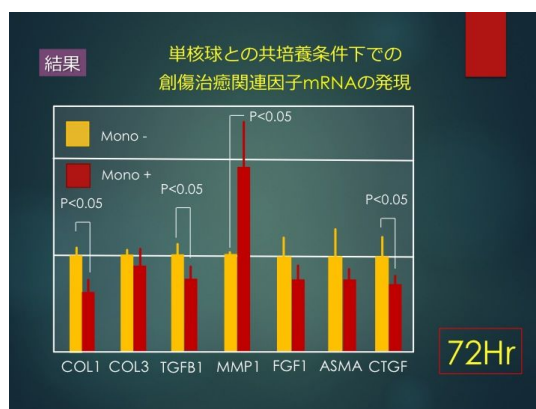
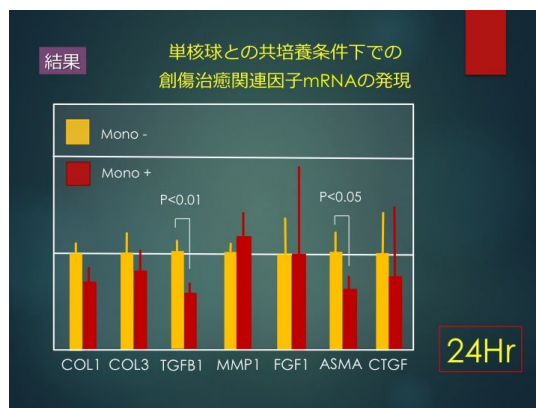
(3)単球・マクロファージ系細胞が線維芽細胞に及ぼす影響
 線維芽細胞は単球・マクロファージ系細胞の存在下ではその増殖が促進されることが明らかとなった(下図)。



また、同様の増殖促進効果は、単球・マクロファージ系細胞の培養上清を線維芽細胞に加えた場合でも認められた(下図)。



続いて、単球・マクロファージ系細胞との共培養下での線維芽細胞の遺伝子発現をリアルタイムPCRで調べたところ、24時間の共培養により、線維芽細胞の transforming growth factor beta1(TGFb1)および alpha smooth muscle actin (aSMA)の発現が低下することが判明した。さらに、72時間の共培養により、線維芽細胞の1型コラーゲン、TGFb1、および connective tissue growth factor (CTGF)の発現が低下する一方、matrix metalloproteinase 1 (MMP1)の発現は上昇することが判明した(次図)。



以上の結果から、創傷治癒過程では、単球・マクロファージ系細胞の分泌する液性因子により、線維芽細胞の増殖は促進されるものの、線維化そのものはむしろ抑制されていることが示唆された。

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2件)

栗田恵里奈、菅浩隆、栗田昌和、江藤ひとみ、佐藤卓士、多久嶋亮彦、波利井清紀、単球・マクロファージ系細胞が線維芽細胞に及ぼす影響の解明、第22回日本形成外科学会基礎学術集会、2013年11月8日、新潟

菅浩隆、栗田昌和、江藤ひとみ、佐藤卓士、多久嶋亮彦、波利井清紀、温度応答性ディッシュを用いた単球・マクロファージ系細胞の継代培養法：創傷治癒研究の新たなアプローチ、第23回日本形成外科学会基礎学術集会、2014年10月9日、松本

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅 浩隆 (SUGA, Hirotaka)

杏林大学・医学部・助教

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