

**Allogeneic Fibroblast Sheets Accelerate Cutaneous Wound
Healing Equivalent to Autologous Fibroblast Sheets in Mice**

(他家線維芽細胞シートは自家線維芽細胞シートと同等に
マウスにおける皮膚創傷治癒を促進する)

氏名 永瀬 隆
所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻
器官病態外科学講座

令和2年11月

目次

1.	要旨	3
2.	研究の背景.....	4
3.	目的	6
4.	方法	7
5.	結果	11
6.	考察	19
7.	結語	22
8.	謝辞	23
9.	参考文献.....	24

1. 要旨

難治性皮膚潰瘍に対する自家細胞シート移植は、既存の治療法よりも高い治療効果が認められている。しかし、自家線維芽細胞シートを臨床で用いるには、患者への侵襲、培養に要する時間、細胞機能の低下、品質検査のコストが個々に生じることが臨床応用へ制限となっている。対照的に、予め製造された他家細胞を用いることは免疫応答の問題はあるものの、自家細胞よりも低コストで高品質な細胞を移植できる利点があり、再生医療の普及および産業化の可能性を秘めている。そこで、本研究では、自家線維芽細胞シートおよび他家線維芽細胞シートにおける創傷治癒効果、細胞生存率および免疫応答の違いを評価することを目的とした。

創傷治癒について、同等の分泌能を有する自家または他家線維芽細胞シートを作製し、マウス皮膚創傷治癒モデルに移植し創傷収縮率を評価した。細胞シートの生存について、ルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートを自家または他家移植し *in vivo imaging* で評価した。治癒組織については、移植後 5・14 日目に組織学的評価を行った。他家線維芽細胞シート移植は、創傷治癒の初期段階で有意な創傷収縮を示し、これは自家線維芽細胞シートと同等であった。自家および他家ルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートの発光は 5 日目にピークに達し、13 日目には発光が観察されなかった。他家線維芽細胞シート移植では、移植 14 日目の治癒組織への有意な免疫細胞の集積が確認されたが、創傷治癒早期である移植 5 日目にはみられなかった。

他家線維芽細胞シートは、その後の免疫原性応答にもかかわらず、自己線維芽細胞シートと同等の細胞生存率および創傷治癒効果を示した。この結果は、自家線維芽細胞シートと同等のパラクライン効果を発揮する他家線維芽細胞シートの実用的な臨床応用の可能性を示す。

2. 研究の背景

慢性創傷は4週間から3ヶ月以上治癒しない創傷と定義される[1]。米国では、慢性創傷は約650万人の患者に影響を及ぼし、毎年250億米ドル以上の医療費が費やされている[2]。これらの疾患は患者の生活の質を低下させ、さらには有病率の増加は医療費の問題を引き起こす[3]。ほとんどの慢性創傷は静脈あるいは動脈性、糖尿病性、褥瘡に分類され[4]、その治癒期間は平均12-13ヶ月間で、再発率は静脈性24%-57%、糖尿病性60%以上、褥瘡23%-40%とされている[5]。従来の治療法が有効ではない慢性創傷に対しては、成長因子、細胞外マトリックス（ECM）、人工皮膚、局所陰圧閉鎖療法（NPWT）などの高度な治療法が施行される。これらの治療法の選択はエビデンスに基づいていないことが多く[3, 6]、より有効かつ安価な治療法の開発が望まれている。

我々は、従来の血行再建術が不可能な動脈性潰瘍患者に対する臨床試験として自己骨髄細胞移植療法を実施し、その治療効果を報告した[7]。さらに骨髄細胞や末梢血単核球における低酸素プレコンディショニングが、移植細胞生存や血管新生能を増加させることを報告した[8-10]。一方で移植領域における移植細胞の生着を改善するために細胞シート技術が確立され[11]、その治療有効性はさまざまな疾患モデルで実証されている[12-14]。そこで我々は、末梢血単核球と線維芽細胞からなる混合細胞シートを開発し、ウサギ下肢虚血モデルや糖尿病モデルマウスにおける創傷治癒効果を報告した[15, 16]。さらに、積層細胞シートでは、従来の単層細胞シートと比較して高い分泌能を示すことを報告した[17]。この積層細胞シートを用いたマウス創傷治癒モデルの実験において、線維芽細胞単独シートと比較して細胞混合シートがより多くの血管新生を認めたものの、創傷治癒効果は同等であった[17]。米国では慢性下肢潰瘍の創傷の原因の45%-90%が静脈性と推定され[18]、そのため多くの慢性創傷の治療においては末梢血単核球を混合することで得られる血管新生能は重要ではな

いかかもしれない。細胞シートを再生医療製品として広く普及させるためには、広範な分泌能を持ち、かつ安価で扱いやすい細胞が必要である。線維芽細胞は、ECMの沈着、収縮、新しいECMのリモデリングなど、すべての創傷治癒段階で重要である。これらの様々な生物学的役割に付随して、線維芽細胞は広範なサイトカインや成長因子などのパラクラインおよびオートクラインにより応答する[19]。近年、間葉系幹細胞(MSC)の多機能で応答性の高い能力が再生医療において注目される一方で、線維芽細胞は細胞採取の簡便さと *in vitro* での増殖能が高いという点から、間葉系幹細胞の代替としての実用性が報告されている[20]。

自家線維芽細胞シートを臨床で用いるには、患者の皮膚または口腔粘膜からの生検、細胞増殖のための長期の体外培養、および再生医療製品の品質検査がそれぞれの治療で必要となる。自家細胞を用いることで患者への侵襲、培養に要する時間、品質検査のコストが個々に生じることは臨床応用へ制限となる。対照的に、品質検査された他家細胞のストックはそれらの問題点を最小限にし、自家ドナー細胞の品質に影響されない均一な細胞を用いる再生医療の幅広い応用と産業化を促進する。創傷治癒における他家細胞を用いる治療は、ケラチノサイトと線維芽細胞からなる培養された皮膚の代替としての製品に始まり、現在も販売されている。しかし、他家細胞は皮膚に生着しないため、これらの製品の治癒メカニズムはよく理解されていない[19]。我々は、細胞シートが移植片として永久的には生着しないこと、他家線維芽細胞シートも強い拒絶反応を示さずに治癒効果を発揮することを報告した[15]。この結果は、最終的に生着しない他家線維芽細胞シートが一定期間のパラクライン効果で治療効果を発揮することを示唆しているが、移植した細胞シートの生着期間や創傷治癒効果については明らかではない。本研究の目的は、創傷治癒における他家線維芽細胞シートの有効性についてマウスを用いた研究で検証することである。

3. 目的

本研究の目的は、創傷治癒における他家線維芽細胞シートの有効性について、マウスにおける創傷治癒と移植細胞生存を自家線維芽細胞シートと比較解析することで治療効果を検証することである。

4. 方法

使用動物

オスの C3H/He マウスとオスの C57BL/6N マウスが Japan SLC 社より購入された。動物実験は、山口大学の動物実験倫理委員会の承認の下、そのガイドラインに則り実施された(#31-093)。

線維芽細胞シートの作製

マウス尻尾の皮膚よりコラゲナーゼ（富士フィルム和光社）を用いて線維芽細胞を単離し、10%ウシ血清（Thermo Fisher Scientific 社）含有の CTSTM AIM V[®] 培地（Thermo Fisher Scientific 社）で培養した。初代線維芽細胞を 5%ウシ血清（Thermo Fisher Scientific 社）含有の CTSTM AIM V[®] 培地（Thermo Fisher Scientific 社）と HFDM-1 (+) 培地（Cell Science & Technology 社）を用いて 48 ウェルプレートに $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ の細胞濃度で 1 mL ずつ播種し、37 °C、5%CO₂、大気酸素濃度の通常条件で 3 日間培養した。

組織学的解析

採取された皮膚組織あるいは細胞シートを移植したハムを 10%緩衝ホルマリオン液で固定し、パラフィン包埋を行い、HE 染色および蛍光染色の切片を作成した。3 μm 厚でスライドガラスにマウントされた組織切片をキシレンで脱パラフィンを行い、段階的なエタノール濃度で親水化した。Target Retrieval Solution (S1699; DAKO 社) を用いた 100°C、30 分の温熱法による抗原賦活化を行い、Blocking Buffer (X0909, DAKO 社) を用いた室温 20 分のブロッキングを行った。用いた抗体を次に示す。一次抗体：ウサギ抗ビメンチン抗体

(ab92547; Abcam 社)、Cy3™標識マウス抗 α 平滑筋アクチン抗体 (C6198; Sigma Aldrich 社)、ウサギ抗 CD3 抗体 (ab16669; Abcam 社)、二次抗体: Alexa Fluor® 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (ab150077; Abcam 社)、DyLight® 550 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (ab96884; Abcam 社)。すべての組織画像は BZ-X710 microscope (Keyence 社) を用いて撮影し、BZ-X Analyzer (Keyence 社) を用いて解析を行った。

細胞シートの細胞生存

2 継代目の初代線維芽細胞を 48 ウェルプレートに $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ の細胞濃度で播種した。MTS reagent (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega 社) と培地を 1 : 5 の割合で混合し、120 μL を各ウェルに加え 37°C で 1 時間反応させた。各ウェルから 100 μL を 96 ウェルプレートに移し、2030 ARVO X4 microplate reader (PerkinElmer 社) を用いて 490 nm の吸光度を測定した ($n = 4$) 。

細胞シートの分泌能 (ELISA 法)

初代線維芽細胞を 5% ウシ血清 (Thermo Fisher Scientific 社) 含有の CTSTM AIM V® 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) と HFDM-1 (+) 培地 (Cell Science & Technology 社) を用いて 48 ウェルプレートに $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ の細胞濃度で 1mL ずつ播種し、37 °C、5%CO₂、大気酸素濃度の通常条件で 3 日間培養した。培養上清 ($n = 3$) を回収し、Quantikine Immunoassay Kit (R&D Systems 社) を用いた ELISA 法で transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) を測定した。

マウス皮膚創傷治癒モデルの作製と細胞シート移植

オスの C3H/He マウスを用いて、1.5%イソフルラン吸入麻酔下に生検パンチで背部皮膚に同サイズの 5mm 皮膚全層欠損創を 2 カ所作製した (n = 5、マウス 1 匹あたり創 2 カ所)。オスの C3H/He マウス由来の線維芽細胞シート (自家移植) とオスの C57BL/6N マウス由来の線維芽細胞シート (他家移植) を作製し、担体としてセプラフィルム (科研製薬社) を用いて皮膚欠損創に移植した。コントロール群にはセプラフィルムのみ移植した。すべての創について最初の 24 時間は ADAPTIC (#2012; Acelity 社) とデルマエイド (ALCARE 社)、以降はエアウォールふわり (#MA-E050-FT; 共和社) フィルムを用いて被覆した。シルキーテックス (#11893; ALCARE) 粘着包帯を用いて創部を固定した。Day 0、3、5、7、9 において、それぞれの創を 8.5-mm 径のメジャーとともにデジタルカメラで撮影した。それぞれの創の写真は 8.5-mm 径のメジャーで規準化され、創面積は ImageJ software (アメリカ国立衛生研究所) を用いた創縁の手動トレースで算出した。Day X の創収縮率は $1 - (\text{Day X の創面積} / \text{Day 0 の創面積})$ で算出される。

マウス初代線維芽細胞へのトランスフェクション

293T 細胞を 5%ウシ血清含有 DMEM 培地 (# 11995-965; Thermo Fisher Scientific 社) を使用して 10cm ディッシュで培養した。1.5 mL チューブに 1 mL の Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific 社)、6 µg の BLIV 2.0 Reporter: MSCV-Luciferase-EF1 α -copGFP-T2A-Puro Lentivector Plasmid (#BLIV713PA-1; System Biosciences 社)、4 µg の pPACKH1 HIV Lentivector Packaging Kit (#LV500A-1; System Biosciences 社)、30 µL の X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (#6366244001; Roche Holding 社) を混合し 20 分間静置した。混合液を 293T 細胞の培地に加え、一晚培養した。培地を交換し、3 日間培養した。培地を 15mL チューブに回収し、3,000 回転、5 分間遠心し、レンチウイルス粒子

を含んだ上清を syringe filter (#SLPES2545S ; Hawach Scientific 社) に通した。C57BL/6N マウスの新生仔より単離培養した初代線維芽細胞を、ウイルス液と最終濃度 8 µg/mL の polybrene (#H9268 ; Sigma-Aldrich) を含む 5% ウシ血清含有 AIM-V 培地で 3 日間培養し、トランスフェクションした。最終濃度 1 mg/mL の Puromycin (#A1113802 ; Thermo Fisher Scientific 社) を用いてルシフェラーゼ発現細胞を選択的に培養した。

ルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートの作製と IVIS を用いた観察

ルシフェラーゼ発現線維芽細胞を用いて前述の通りに細胞シートを作製した。ルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートを C57BL/6N マウス (n = 6、自家移植)、C3H/H3 マウス (n = 5、他家移植) にセプラフィルムを用いて移植した。コントロール群 (n = 3、C57BL/6N マウス、n = 3、C3H/He マウス) はセプラフィルムのみ移植した。生体内イメージング装置による観察は Day 2、5、9、13 に行い、測定 5 分前に 200 µL (120 mg/kg) の D-luciferin (#XLF-1 ; Promega 社) を腹腔内注射し、IVIS® SpectrumBL (PerkinElmer 社) を用いて 5 分の露光時間で発光シグナルを測定した。Living Image® Software 4.4 (PerkinElmer 社) を用いて、シグナルと写真の融合画像から創部に等面積の ROI を設定し photon 数を定量化した。

統計学的解析

値は平均 ± 標準偏差で表示した。2 つのグループ間の比較は両側の対応のない t 検定で評価した。3 つのグループ間でのパラメーターの比較は、一元配置分散分析とそれに続く Tukey の多重比較検定で評価した。0.05 未満の p 値を統計的に有意であると見なした。すべての統計分析は、GraphPad Prism 7 ソフトウェア (GraphPad Software 社) を使用した。

5. 結果

線維芽細胞シートの作製とマウスモデルへの移植

オスの C3H/He マウスとオスの C57BL/6N マウスの尻尾の皮膚から線維芽細胞を単離培養した。我々は、温度応答性培養プレートを使用せずに通常の培養プレートを用いて細胞シートの自然剥離を防ぎ、できるだけ多くの細胞（24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 5.0×10^5 個）を使用した「積層細胞シート（multi-layered cell sheet）」の作製方法を報告した[17]。培養した初代線維芽細胞を積層細胞シート（ $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ）として 48 ウェルプレートに播種し、通常酸素条件下で 3 日間培養した。培養プレートの底から細胞シートを静かに剥離した。オスの C3H/He マウス由来線維芽細胞シート（自家移植）とオスの C57BL/6N マウス由来線維芽細胞シート（他家移植）を、C3H/He マウスの 5mm 径の全層皮膚欠損創傷治癒モデルの皮膚欠損部位に移植した（図 1A）。剥離した線維芽細胞シートは自然に収縮することで、細胞シートの直径は約 5 mm になり（図 1B）、厚さは 50 μm であった（図 1C）。

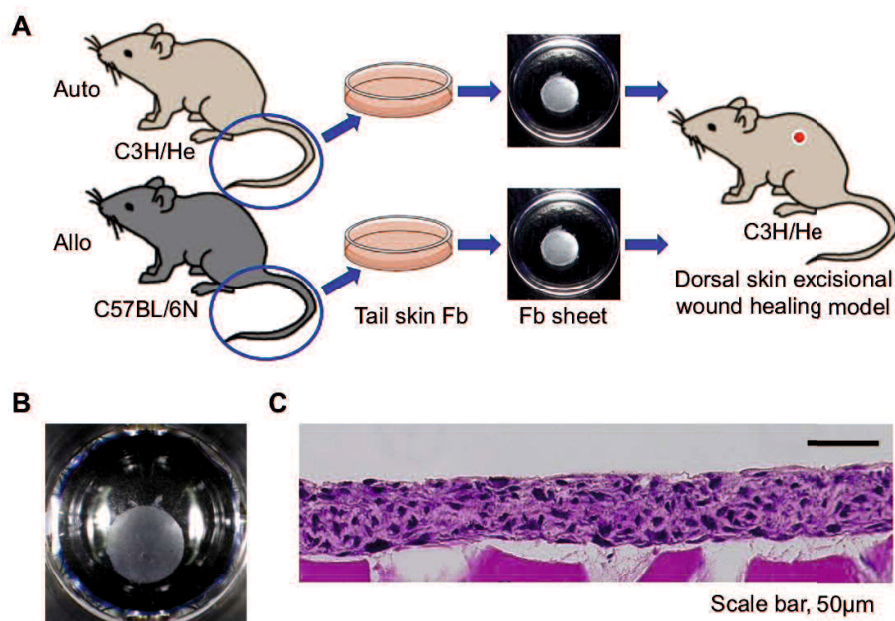


図 1. 線維芽細胞シートの作製とマウスモデルへの移植

A. オスの C3H/He マウスとオスの C57BL/6N マウスの尻尾の皮膚から線維芽細胞を単離培養した。培養した初代線維芽細胞を 48 ウェルプレート ($2.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$) に播種し、通常酸素条件下で 3 日間培養した。細胞シートを C3H/He マウスの全層皮膚欠損創傷治癒モデルの皮膚欠損に移植した。B. 写真は、ウェル底から剥離した 1 枚の線維芽細胞シートを示す。ウェルの直径は 10 mm。 C. H&E 染色で線維芽細胞シートの断面を示す。

分泌能と細胞生存における自家および他家線維芽細胞シートの同等性

線維芽細胞シートから分泌される成長因子とサイトカインを評価するために、各細胞シートの上清中の TGF- β 1、VEGF、および MCP-1 を ELISA 法で測定した。TGF- β 1、VEGF、および MCP-1 の濃度は、オスの C3H/He マウス線維芽細胞シートの上清とオスの C57BL/6N マウス線維芽細胞シートの上清で同じレベルであった ($p = 0.28$ 、 $p = 0.34$ 、および $p = 0.81$) (図 2A)。TGF- β 1 は培地で検出されたが、線維芽細胞シートの上清の TGF- β 1 は、培地と比較して有意に増加した (培地 vs. C3H/He : $p = 0.0003$ 、t 検定、培地 vs. C57BL/6N : $p = 0.0047$ 、t 検定)。VEGF と MCP-1 はいずれも培地では検出されなかった (データは非表示)。積層線維芽細胞シートの細胞生存を MTS 増殖アッセイにより測定した。2 種類の線維芽細胞シートはほぼ同じ生存率を示し、in vitro での細胞密度にもかかわらず細胞生存率は増加した (図 2B)。

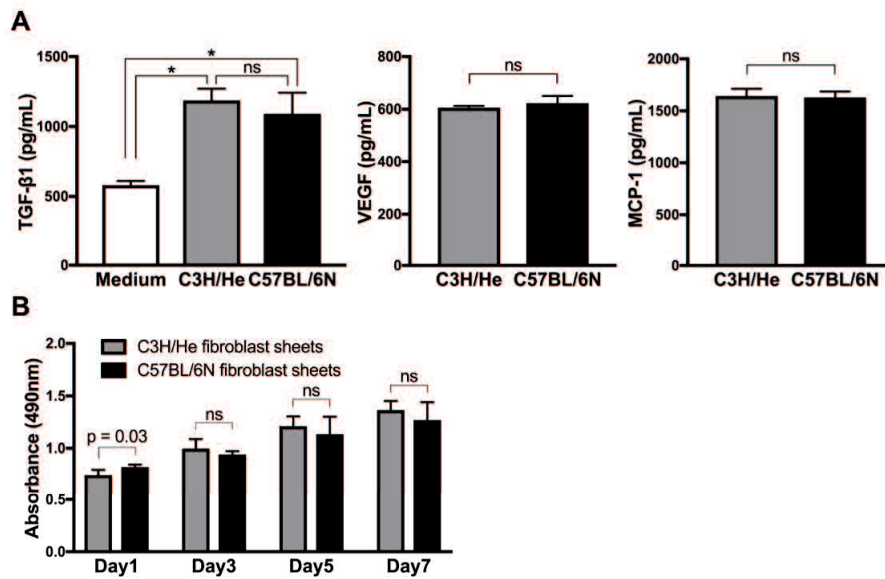


図 2. 分泌能と細胞生存における自家および他家線維芽細胞シートの同等性
 A. ELISA 法で測定した C3H/He マウス由来線維芽細胞シートおよび C57BL/6N マウス由来線維芽細胞シートの上清中の TGF-β1、VEGF、および MCP-1 の濃度を示す。B. Day 1、3、5、7 の細胞シートの生存を、MTS 増殖アッセイにより測定した。

ルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートの生存

自家あるいは他家の線維芽細胞シートの細胞生存を評価するために、C57BL/6N 新生児マウスのルシフェラーゼ発現線維芽細胞シート C57BL/6N マウス（自家移植）あるいは C3H/He マウス（他家移植）の皮膚欠損に移植した。移植されたすべての細胞が創傷部位で生存し、創傷を越えて播種されず、経時的に減少したことを代表的な画像で示した（図 3A）。定量分析によると、発光シグナルは Day 5 にピークに達し、発光シグナルのレベルは他家線維芽細胞シートよりも自家線維芽細胞シートのほうが有意に高値であった。Day 9 では 3 群間で発光シグナルに統計的な差は認めなかった。Day 13 では発光シグナルは検出されなかった（図 3A、* : $p < 0.01$ 、** : $p < 0.0001$ ）。

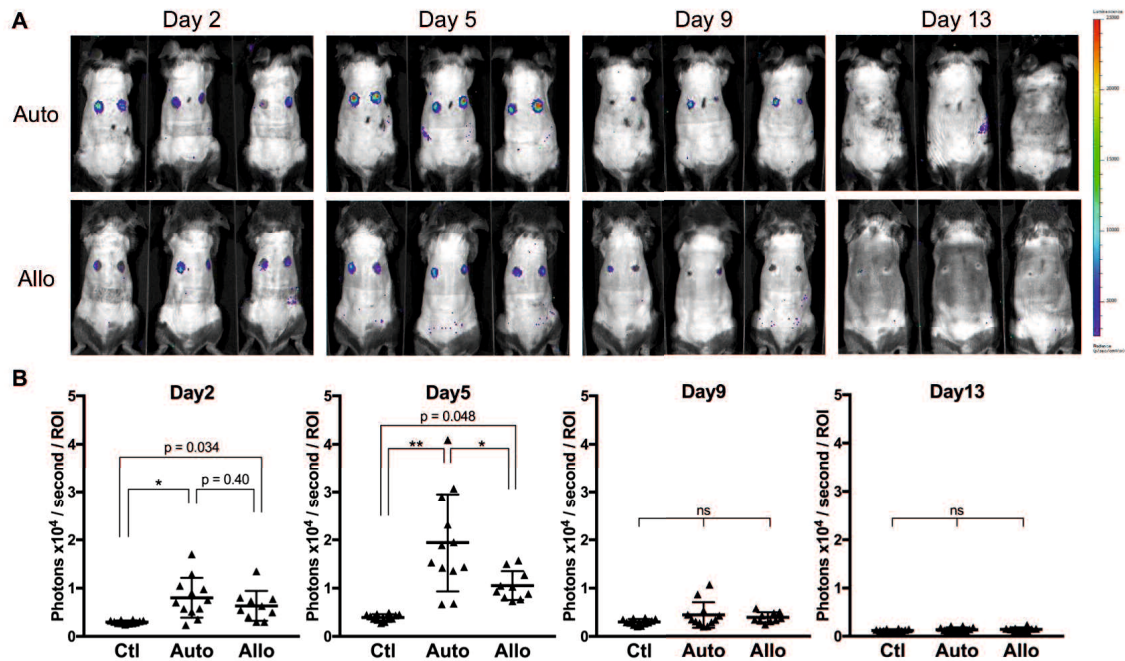


図3. 生体内イメージング装置による細胞シート生存の評価

A. 写真（白黒）と発光（カラー）の代表的なフュージョン画像。カラースケールによる発光シグナルは、移植された線維芽細胞シートの生細胞を示す。

B. 発光シグナルの定量解析。フュージョン画像の創部に等面積の ROI が設定された。* : $p < 0.01$ 、** : $p < 0.0001$ 。

マウス皮膚創傷治癒モデルにおける創収縮

細胞シートの創傷治癒効果を評価するために、オスの C3H/He マウス線維芽細胞シート（自家移植）およびオスの C57BL/6N マウス線維芽細胞シート（他家移植）を、オスの C3H/He マウス背部全層皮膚創傷治癒モデルの 5 mm 皮膚欠損創に移植した。続いて Day 0、3、5、7、9 に各創面積を評価した（統計的に $n = 10$ として解析）（図 4A）。創収縮率は、Day 3 [自家および他家 vs. コントロール : 0.218 ± 0.028 ($p < 0.0001$) および 0.221 ± 0.033 ($p < 0.0001$) vs. -0.059 ± 0.044] と Day 5 [自家および他家 vs. コントロール : 0.470 ± 0.025 ($p = 0.0006$) および 0.466 ± 0.028 ($p = 0.0009$) vs. $0.278 \pm$

0.041] において、自家および他家線維芽細胞シート移植治療群がコントロール群と比較して有意に高値であった。 Day 7 において、他家線維芽細胞シート治療群の創収縮率はコントロール群よりも高かったが、統計的に有意ではなかった [自家および他家 vs.コントロール: 0.599 ± 0.024 ($p = 0.0094$) および 0.569 ± 0.019 ($p = 0.077$) vs. 0.497 ± 0.024]。 Day 9 において、3 群間の創収縮率に有意差は認めなかった ($p = 0.11$) (図 4B)。

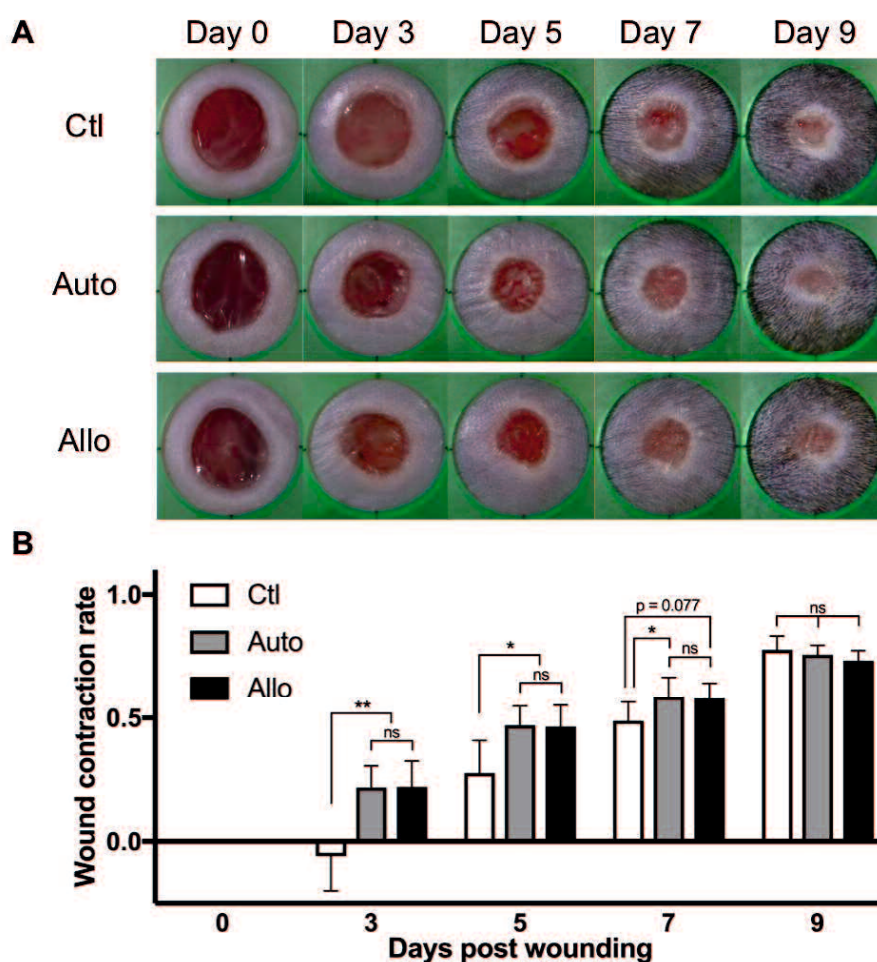


図 4. マウス皮膚創傷治癒モデルにおける創傷治癒効果

A. Day 0、3、5、7、9、11 の創部の代表的な画像を示す。オスの C3H/He マウス背部全層皮膚創傷治癒モデルに、オスの C3H/He マウス由来線維芽細胞

シート（自家移植；Auto）、オスの C57BL/6N マウス由来線維芽細胞シート（他家移植；Allo）、コントロール（担体のみ移植；Ctl）。B. 線維芽細胞シートの移植後の創傷収縮率の測定。*： $p < 0.01$ 、**： $p < 0.0001$ 。

創部の肉芽形成と筋線維芽細胞

H&E 染色切片では、Day 5 において自家または他家線維芽細胞シート治療群で、潰瘍底の肉芽組織、平滑な創縁および創収縮が観察された（図 5A）。Day 14 において、肉芽組織および創面積はすべての群でほぼ同じであったが、他の群と比較して他家線維芽細胞シート群ではより多くの炎症細胞浸潤が観察された（図 5B）。創傷治癒経過中の筋線維芽細胞の集積を明らかにするために免疫組織蛍光染色を行った。ビメンチンおよび α 平滑筋アクチン（ α -SMA）の二重染色を行った。ビメンチンは線維芽細胞のマーカーで、ビメンチンと α -SMA の二重陽性細胞は筋線維芽細胞を示す。Day 5 において、すべての群の皮膚潰瘍の創縁に多くの線維芽細胞が観察された。自家および他家線維芽細胞シート治療群でより多くの筋線維芽細胞が観察された。Day 5 と比較して、Day 14 の肉芽組織ではごくわずかな筋線維芽細胞が観察された（図 6A）。Day 5 において、線維芽細胞全体に対する筋線維芽細胞の比率は他家線維芽細胞シート治療群がコントロール群と比較して有意に高値であり [他家 vs. コントロール：16.95% \pm 1.643% vs. 10.54% \pm 1.419%、($p = 0.020$)]、他の群間に有意差を認めなかった。Day 14 において 3 群間に有意差を認めなかった [コントロール、自家、他家：1.888% \pm 0.2721%、1.118% \pm 0.2053%、1.914% \pm 0.4348%、($p = 0.16$)]（図 6B）。

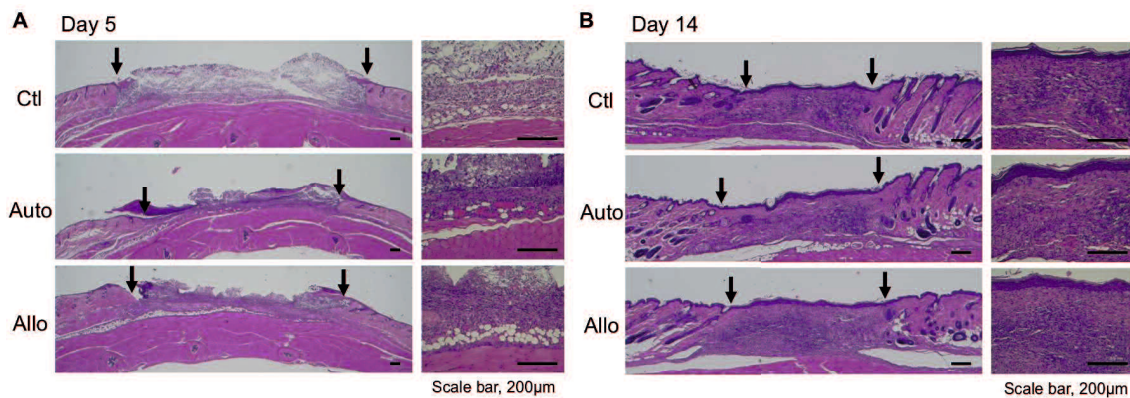


図 5. H&E 染色の創部全体の画像と創傷中心の拡大画像

2つの矢印は潰瘍の両端を示す。A. Day 5、 B. Day 14。Scale bar = 200

μm。

治癒過程における T リンパ球浸潤

他家線維芽細胞シートの免疫拒絶を評価するために、T リンパ球のマーカーとしての CD3 陽性細胞を免疫組織蛍光法で観察し、組織学的に評価した。Day 5 において、3 群すべてでわずかな創部に浸潤した T リンパ球を認めた。Day 14 において、他家線維芽細胞シート治療群でコントロール群および自家線維芽細胞シート治療群と比較してより多くの T リンパ球が観察された (図 6C)。肉芽組織に浸潤した T リンパ球の数を単位面積ごとに定量化した。Day 5 における T リンパ球数は、3 群間に有意差を認めなかった [コントロール、自家、他家 : 20.34 ± 23.62 cells/mm²、 18.48 ± 2.676 cells/mm²、 20.85 ± 2.471 cells/mm² (p = 0.81)]。Day 14 における T リンパ球数は、他家線維芽細胞シート治療群がコントロール群と自家線維芽細胞シート治療群と比較して有意に高値であった [他家 vs. コントロールおよび自家 : 761.3 ± 87.25 cells/mm² vs. 92.88 ± 10.67 cells/mm² (p < 0.0001) および 87.79 ± 7.074 cells/mm² (p < 0.0001)] (図 6D)。創傷治癒の初期段階において他家線維芽細胞シートの有

意な免疫拒絶を認めなかった。Day 14 の治癒後の組織において病理学的免疫応答が観察された。

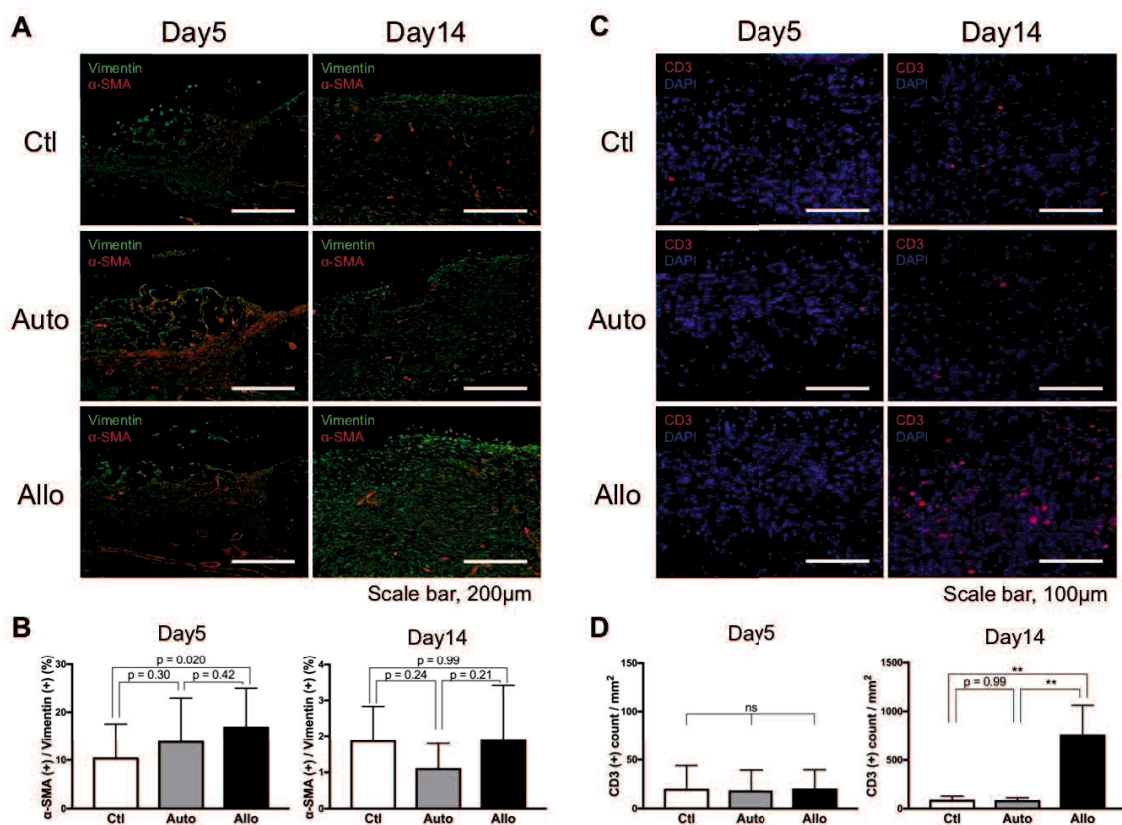


図 6. 皮膚創部の免疫組織化学蛍光染色画像

A. 線維芽細胞（ビメンチン：緑）および α -SMA（赤）の二重染色。ビメンチンと α -SMA の二重陽性細胞は筋線維芽細胞を示す。Day 5 は潰瘍の両端に、Day14 は創部の中心を示す。Scale bar = 200 μ m。 α -SMA : α -平滑筋アクチン。 B. 線維芽細胞に対する筋線維芽細胞の定量比。 C. Day 5 および Day 14 の T リンパ球のマーカーとしての CD3 陽性細胞の肉芽組織への浸潤を示す。T リンパ球（CD3 : 赤）および核（DAPI : 青）。 Scale bar = 100 μ m。 DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole。 D. Day 5 および Day14 の肉芽組織の平方ミリメートルあたりの CD3 陽性細胞数の定量化。

6. 考察

我々のデータは、他家線維芽細胞シート移植は組織学的な免疫応答にもかかわらず、自家線維芽細胞シート移植と同等の創傷治癒効果をもたらすことを示した。今回の検証に用いたスキヤフォールドフリーの細胞密度の高い線維芽細胞シートが様々な成長因子やサイトカインの分泌能をもつことについては以前報告した[17]。線維芽細胞が分泌する TGF- β 1 は筋線維芽細胞の細胞外マトリックス産生と分化に関連しており[21]、VEGF は血管新生を促進し、MCP-1 はマクロファージの走化能を促進し、創傷治癒効果を示すと考えられる（図 2A）。自家線維芽細胞シートと他家線維芽細胞シートはともに同等の分泌能と生存率を示し（図 2A、2B）、創傷治癒早期には有意な免疫細胞の浸潤を認めなかった（図 6C、6D）。これらの結果は、自家線維芽細胞シートと他家線維芽細胞シートの両方で同程度の創傷治癒効果をもたらしたことを裏付ける可能性があります（図 4A、4B）。

生体内イメージングにおける発光量はルシフェラーゼ発現細胞の生存細胞数に比例する。我々の知る限り、創傷治癒における細胞シートの生存の生体内イメージングによる分析はこれまで検討されていない。生体内イメージングによる細胞シートの分析は細胞シート内で減少していく細胞のわずかな発光を測定するため、腫瘍細胞の増殖を扱う実験とは異なる。この実験における創傷治癒の課程でコントロール群の発光の一時的な増加は、その血流増加によるバックグラウンドノイズである可能性があり、発光量が生細胞数を正確に反映していない可能性がある。しかし、コントロール群と比較したルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートの発光量の有意な違いは移植細胞の生存の有無を証明するのに十分であった。本研究ではルシフェラーゼ発現線維芽細胞シートはいずれも 5 日目を発光のピークとして創部に生着し、13 日目での生着は確認されなかった

(図 3A、3B)。この結果は、自家あるいは他家の線維芽細胞シートのパラクライン効果が移植後早期に発揮され、移植後 3 日、5 日、7 日目の創傷治癒を促進したことを支持する可能性がある (図 4)。他家線維芽細胞シートの細胞生存期間は、自家線維芽細胞シートの細胞生存期間と同じであった。したがって、他家線維芽細胞シートは自家線維芽細胞シートと同じパラクライン効果を示して創傷治癒とともに消失し、いずれの線維芽細胞シートも造腫瘍性がないことが示された。

線維芽細胞の活性化は創傷治癒に重要な役割を果たすが、制御不能な活性化は病理学的な線維性反応を引き起こす場合がある [19]。線維芽細胞シート移植群において創傷治癒早期に筋線維芽細胞が多く観察され (図 6A、6B)、これらの筋線維芽細胞は、自家あるいは他家線維芽細胞シートによって分泌された TGF- β 1 によって誘導される可能性があり (図 2)、創傷収縮の一因となった可能性がある。しかしながら、線維芽細胞シート移植後の治癒組織にはケロイドのような筋線維芽細胞の過剰発現を認めなかった。これは線維芽細胞シート移植の治療効果は自然な創傷治癒の促進であり、治癒後の線維化や瘢痕へ影響しない可能性を示唆する。

他家細胞移植における懸念は免疫学的問題と拒絶反応の可能性であるが、他家線維芽細胞とケラチノサイトからなる培養皮膚の臨床使用において、疼痛、紅斑、壊死などの拒絶反応と証明された臨床徴候は認めていない [22, 23]。これは他家線維芽細胞の臨床使用の安全性を示すものであるが、その免疫応答が創傷治癒効果にどう影響を及ぼしているかは明らかではない。本研究では、移植後早期に自家・他家線維芽細胞シートが生着しパラクライン効果を発揮し、それに遅れて他家細胞シートへの宿主の免疫応答が開始された (図 3A、3B、6A、6D)。自家および他家線維芽細胞シートの細胞生存率は創傷治癒経過で

徐々に減少するため、他家線維芽細胞シートの生存細胞の減少により免疫拒絶が最小限に抑えられ、創傷治癒効果に影響を与えなかった可能性がある。

本研究は正常なマウスの創傷治癒を評価した実験であり、創傷治癒が遅延する動物モデルでの検証が必要かもしれない。創傷治癒のメカニズムについてはさらなる解明が必要であるが、我々の示したパラクライン効果に基づく線維芽細胞シートの創収縮促進効果は、慢性潰瘍に対する創傷治癒への引き金となるだろう。

7. 結語

他家線維芽細胞シートは、その後の免疫反応にもかかわらず、自家線維芽細胞シートと同等の細胞生存および創傷治癒効果を示した。線維芽細胞の採取の簡単さ、細胞増殖能の高さ、他家細胞の利便性と相まって、パラクライン効果に基づくスキュフォールドフリーである本研究の方法に基づく他家線維芽細胞シート移植は、臨床応用可能であることが示唆された。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました山口大学大学院 器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に感謝申し上げます。

また、実験のご指導をいただきました、上野耕司先生（山口大学大学院 器官病態外科学講座）に感謝申し上げます。

9. 参考文献

- [1] K. Jarbrink, G. Ni, H. Sonnergren, A. Schmidtchen, C. Pang, R. Bajpai and J. Car. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* **5**, 152 (2016).
- [2] C. K. Sen, G. M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T. K. Hunt, F. Gottrup, G. C. Gurtner and M. T. Longaker. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen* **17**, 763-771 (2009).
- [3] N. A. Richmond, A. D. Maderal and A. C. Vivas. Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol Ther* **26**, 187-196 (2013).
- [4] R. Nunan, K. G. Harding and P. Martin. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech* **7**, 1205-1213 (2014).
- [5] F. Werdin, M. Tennenhaus, H. E. Schaller and H. O. Rennekampff. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty* **9**, e19 (2009).
- [6] R. G. Frykberg and J. Banks. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **4**, 560-582 (2015).
- [7] K. Esato, K. Hamano, T. S. Li, A. Furutani, A. Seyama, H. Takenaka and N. Zempo. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* **11**, 747-752 (2002).
- [8] M. Kubo, T. S. Li, H. Kurazumi, Y. Takemoto, M. Ohshima, T. Murata, S. Katsura, N. Morikage, A. Furutani and K. Hamano. Hypoxic preconditioning enhances angiogenic potential of bone marrow cells with aging-related functional impairment. *Circ J* **76**, 986-994 (2012).
- [9] M. Kubo, T. S. Li, R. Suzuki, B. Shirasawa, N. Morikage, M. Ohshima, S. L. Qin and K. Hamano. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H590-595 (2008).

- [10] T. Kudo, T. Hosoyama, M. Samura, S. Katsura, A. Nishimoto, N. Kugimiya, Y. Fujii, T. S. Li and K. Hamano. Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun* **444**, 370-375 (2014).
- [11] T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* **24**, 2309-2316 (2003).
- [12] K. Matsuura, R. Utoh, K. Nagase and T. Okano. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J Control Release* **190**, 228-239 (2014).
- [13] Y. Sawa and S. Miyagawa. Cell sheet technology for heart failure. *Curr Pharm Biotechnol* **14**, 61-66 (2013).
- [14] T. Ohki, M. Yamato, M. Ota, R. Takagi, D. Murakami, M. Kondo, R. Sasaki, H. Namiki, T. Okano and M. Yamamoto. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* **143**, 582-588.e582 (2012).
- [15] K. Ueno, Y. Takeuchi, M. Samura, Y. Tanaka, T. Nakamura, A. Nishimoto, T. Murata, T. Hosoyama and K. Hamano. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep* **6**, 28538 (2016).
- [16] Y. Takeuchi, K. Ueno, T. Mizoguchi, M. Samura, T. Harada, A. Oga, T. Murata, T. Hosoyama, N. Morikage and K. Hamano. Ulcer healing effect of autologous mixed sheets consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells in rabbit ischemic hind limb. *Am J Transl Res* **9**, 2340-2351 (2017).
- [17] T. Mizoguchi, K. Ueno, Y. Takeuchi, M. Samura, R. Suzuki, T. Murata, T. Hosoyama, N. Morikage and K. Hamano. Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Cell Physiol Biochem* **47**, 201-211 (2018).
- [18] N. Hedayati, J. G. Carson, Y. W. Chi and D. Link. Management of mixed arterial venous lower extremity ulceration: A review. *Vasc Med* **20**, 479-

486 (2015).

[19] R. T. Kendall and C. A. Feghali-Bostwick. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol***5**, 123 (2014).

[20] T. E. Ichim, P. O'Heeron and S. Kesari. Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *J Transl Med***16**, 212 (2018).

[21] D. G. Janson, G. Saintigny, A. van Adrichem, C. Mahe and A. El Ghalbzouri. Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol***132**, 2565-2572 (2012).

[22] V. Falanga, D. Margolis, O. Alvarez, M. Auletta, F. Maggiasco, M. Altman, J. Jensen, M. Sabolinski and J. Hardin-Young. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group. *Arch Dermatol***134**, 293-300 (1998).

[23] K. G. Donohue, P. Carson, M. Iriondo, L. Zhou, L. Saap, K. Gibson and V. Falanga. Safety and efficacy of a bilayered skin construct in full-thickness surgical wounds. *J Dermatol***32**, 626-631 (2005).