

学位論文 (博士)

Cryopreserved allogenic fibroblast sheets:  
development of a promising treatment for  
refractory skin ulcers

(難治性皮膚潰瘍に対する凍結保存した  
他家線維芽細胞シート移植治療の開発)

氏名 池 創一

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4年 7月

## 目次

|          |   |
|----------|---|
| 1. 要旨    | 1 |
| 2. 研究の背景 |   |
| 3. 目的    |   |
| 4. 方法    |   |
| 5. 結果    |   |
| 6. 考察    |   |
| 7. 結語    |   |
| 8. 謝辞    |   |
| 9. 参考文献  |   |

## 1. 要旨

本研究の目的は、皮膚潰瘍モデルマウスにおいて、凍結保存した他家線維芽細胞シートの治療効果を検討することである。他家細胞シートの凍結保存が可能であれば、様々な疾患への応用が可能であり、大幅なコストダウンによる再生医療の普及に貢献できると考えられる。本研究では、3Dフリーザーを用いて線維芽細胞シートの凍結を行った。凍結融解した線維芽細胞シートは、非凍結線維芽細胞シートと比較して、細胞生存率は約80%であり、vascular endothelial growth factor (VEGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、stromal derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ )の培養上清中の濃度が50%以上で、transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)の分泌能は同等であった。皮膚潰瘍モデルマウスにおいて、非凍結線維芽細胞シート群と凍結融解した線維芽細胞シート群の間で、自家細胞、他家細胞のどちらも創傷治癒率に差はなかった。また、血管新生の程度も同等であった。治癒組織におけるCD3陽性細胞数は、自家線維芽細胞シート群と比較して他家線維芽細胞シート群で多く見られた。しかし、病理組織学的には、凍結融解した他家線維芽細胞シート群の線維化、新生血管密度、創傷治癒速度は、非凍結他家線維芽細胞シート群に比べて凍結融解した自家線維芽細胞シート群に類似していた。これらの結果から、凍結融解した他家線維芽細胞シートが難治性皮膚潰瘍に対する有望な治療オプションとなる可能性が示唆された。

## 2. 研究の背景

先進国では、褥瘡や血管性、炎症性、リウマチ性による慢性難治性皮膚潰瘍の患者が多くみられ、高齢者や糖尿病患者の増加に伴い、患者数はさらに増加すると予想されている。慢性潰瘍は治癒に時間がかかり[1]、再発も多いため、その治療費は無視できないものとなっている[2]。臨床現場では、閉塞性動脈硬化症、静脈不全、糖尿病などが原因で、軟膏、ドレッシング材、局所陰圧閉鎖療法、高気圧酸素治療、手術などの治療に反応しない難治性皮膚潰瘍の症例が多くみられる [2-5]。そのため、難治性皮膚潰瘍に対する新規治療法の開発が重要である。

細胞シート技術は、高い細胞生着効率を有する細胞移植法として有効であることが報告されている[6]。我々は以前の研究で、幹細胞シートが虚血心における血管新生を誘導し、心機能を改善することを報告した[7-9]。また、重症下肢虚血で難治性皮膚潰瘍がある患者に対して、細胞移植の臨床研究を行った[10, 11]。さらに、難治性皮膚潰瘍に細胞シートを移植することで、潰瘍を治癒させることができるのではないかと考え、皮膚潰瘍の動物モデルにおいて、自己細胞混合シート移植に関する研究を行った[12-15]。臨床試験では、患者由来の組織から移植に適した良質な細胞を十分に分離できなかったため、細胞移植を行うことができなかった[15]。したがって、細胞シート移植を必要とする患者に対しては、他家細胞シートの移植を開発すべきであると考えた。先行研究として、難治性皮膚潰瘍に対する他家細胞シート治療の開発を目的に、皮膚潰瘍モデルマウスで自家および他家の線維芽細胞シートを移植した。その結果、他家線維芽細胞シート群と自家線維芽細胞シート群で同等の治療効果が得られた[16]。

現在、再生医療の普及を阻む課題の一つに高コストがあり、普及のためにはコスト削減が必要である。そこで、コスト削減の手段として、細胞シートの凍結保存に着目した。他家細胞移植の利点は、細胞をあらかじめ培養して保存しておく、必要な時に移植できることである。凍結保存は、通常は細胞を細胞保存液に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで凍結保存するか、プログラムフリーザーなどの装置で凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで保存する。しかし、これらの方法は、3次元(3D)構造である細胞シートの凍結には適していない。我々は、全方向から均一な温度の冷気を用いて物体を凍結させる3Dフリーザーが、細胞シートの凍結保存に有用である可能性を報告しており[17]、本研究では3Dフリーザーを用いて凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで保存した線維芽細胞シートの機能を評価した。

細胞シートの治療効果は、糖尿病モデルマウスを用いた創傷治癒率の測定と、創部の病理組織学的な観点から評価した。CD3 陽性細胞は、他家細胞シート移植後に組織内に集積することが報告されており[16, 18]、本研究では凍結融解した他家線維芽細胞シートの免疫原性の指標として、CD-3 陽性細胞の集積を観察した。その結果、凍結融解した他家線維芽細胞シートの治療効果は、自家線維芽細胞シートと同等であった。

### 3. 目的

本研究の目的は、皮膚潰瘍モデルマウスにおいて、凍結融解した他家線維芽細胞シートの治療効果を検討することであり、凍結融解した他家線維芽細胞シート群の治療効果を、非凍結の他家線維芽細胞シート群および自家線維芽細胞シート群と比較した。

### 4. 方法

#### 使用動物

オスの C3H/He と C57BL/6 マウスを日本エスエルシー株式会社より購入した。実験に用いられたマウスは調整された環境（室温：22±2℃、12時間の明暗サイクル）で飼育された。すべてのマウスに対する手術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、全身麻酔で施行し、除痛について最大限の配慮を行った（#31-093）。

#### 糖尿病モデルマウスの作製

C57BL/6 マウスに、5日間連続でストレプトゾトシンを 55mg/kg 腹腔内投与した。投与終了から1週間後に血糖測定を行い、血糖 $\geq$ 300mg/dL以上の個体を糖尿病モデルマウスとした。

#### 線維芽細胞シートの作製

マウスの尾の皮膚からコラゲナーゼ（富士フィルム和光純薬株式会社）を用いて線維芽細胞を分離し、CTS™ AIM V™（Thermo Fisher Scientific 社）に10%牛胎児血清（Thermo Fisher Scientific 社）を加えて培養した。初代線維芽細胞は、CTS™ AIM V™と HFDM-1 (+)（細胞科学技術研究所）に5%牛胎児血清を加えた培地 2mL を用いて、24穴プレートに播種し（ $4.2 \times 10^5$  個/well）、37℃、

5%CO<sub>2</sub> で 3 日間培養した。一方、凍結融解した線維芽細胞シートは 1 日のみ培養し、24 穴プレートから培養液を除去した後、STEM CELL BANKER® GMP grade(ZENOAQ Resource 社)または STEM CELL BANKER® DMSO-free GMP grade (ZENOAQ Resource 社) を 300 μ L/well 添加した。プレートを-35°C に設定した 3D フリーザー (古賀産業株式会社) に 20 分間入れて細胞を凍結させた後、-80°C のディープフリーザーに移し替えた。凍結保存した細胞を Thermo Plate® (東海ヒット株式会社) 上で 37°C、12 分間の条件で解凍し、その後 2 日間培養した。

#### 病理組織学的解析

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、アゾカルミン・アニリンブルー (Azan) 染色、および蛍光免疫染色のために、創部組織または線維芽細胞シートを採取し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンに包埋した。切片は厚さ 3 μ m で切り出し、スライドガラスにマウントし、キシレンで脱パラフィンし、段階的エタノール系列で再水和した。熱による抗原回収は、Target Retrieval Solution (S1699; Dako Cytomation A/S) を用いて 100°C で 30 分間行い、ブロッキングバッファー (X0909; Dako) とともに室温で 20 分間インキュベートした。蛍光免疫染色には、以下の抗体を使用した。抗 F4/80 (ab16911; Abcam 社); 抗 CD3 (ab16669; Abcam 社); 抗 α SMA (ab5694; Abcam 社); 抗 CD31 (ab28364; Abcam 社); 抗 GFP pAb (598; MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES 社); 精製抗マウス MHC クラス II (I-A/I-E) (M5/114.15.2) (70-5321-U100; Tonbo Biosciences 社); goat anti-rabbit IgG H&L secondary, Alexa Fluor® 488 conjugate (ab150077; Abcam 社); goat anti-rabbit IgG H&L secondary, DyLight® 550 conjugate (ab96884; Abcam 社); and donkey anti-rat IgG H&L secondary, DyLight® 550 conjugate (ab102261; Abcam 社)。すべての組織画像は、BZ-X710 顕微鏡 (Keyence 社) で撮影し、BZ-X Analyzer (Keyence 社) で定量化した。

#### 細胞生存率評価

初代線維芽細胞を 1 回継代した線維芽細胞を、24 穴プレートに ( $4.2 \times 10^5$  cells/well) で播種し、Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque 株式会社) と培地を 1 : 10 で混和して 550 μ L/well 加えて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で 1 時間

培養した。培養後に、各ウェル (n = 4) から 110  $\mu$ L ずつ上清を回収し 96 穴プレートに移し、2030 ARVO X4 マイクロプレートリーダー (PerkinElmer 社) を用いて測定した。

#### 培養上清中の成長因子の測定

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) は、非凍結細胞シートまたは凍結融解した細胞シート培養した後の上清中の vascular endothelial growth factor (VEGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1)、stromal derived factor-1  $\alpha$  (SDF-1  $\alpha$ ) について ELISA キット (#MMV00、#MHG00、#MB100B、#MCX1201 ; R&D Systems 社) を使用した。非凍結細胞シートは 1 日間培養後に、凍結融解シートの条件に合わせるため培地を入れ替えた。また、各サンプルの濃度は、細胞を培養していない細胞培養液の濃度を差し引いた。

#### 皮膚潰瘍モデル作成と細胞シート移植

C57BL/6 糖尿病モデルマウスを 1.5%イソフルランで吸入麻酔し、背部皮膚に生検パンチで径 6mm の皮膚全層欠損創を作成した。C57BL/6 マウス由来の線維芽細胞シート (自家移植) および C3H/He マウス由来の線維芽細胞シート (他家移植) をセプラフィルム® (科研製薬株式会社) を担体として創部に移植した。対照群ではセプラフィルム®のみを移植した。創部に細胞シート移植した後は、ADAPTIC (#2012 ; Acelity 社) と Derma-aid® (ALCARE 社) で移植後 24 時間保護し、その後は Airwall Fuwari (#MA-E050-FT ; Kyowa 社) とシルキーテックス包帯 (#11893 ; ALCARE 社) で創保護と固定を行った。移植後 0、1、3、5、7、9、11、13、15 日目に創部をデジタルカメラで撮影した。各写真は 10.5 mm 径の測定値で正規化し、創傷面積は Image-J (National Institutes of Health) を用いて測定した。創傷収縮率は以下のように算出した。X 日目 = 1 - (創傷面積 [X 日目] / 創傷面積 [0 日目])。

#### GFP マウス由来の細胞シート移植

オスの GFP トランスジェニックマウス (C57BL6/Tg14) の尾から線維芽細胞を分離した。凍結融解した細胞シートは、上記の作製方法に従って作製した。細胞シートを C57BL/6 糖尿病モデルマウスの背部創に移植した。

## 統計処理

数値は平均値±標準偏差で表した。2群間の比較は、両側不對 t 検定で評価した。3群間の比較は、反復測定による一元配置分散多重比較とボンフェローニ調整により行った。確率値 0.05 未満を統計的に有意であるとみなした。すべての統計解析は、Stata 16 (Stata 社) を用いて行った。

## 5. 結果

### 冷凍保存した線維芽細胞シートの構造、生存率、成長因子の分泌量

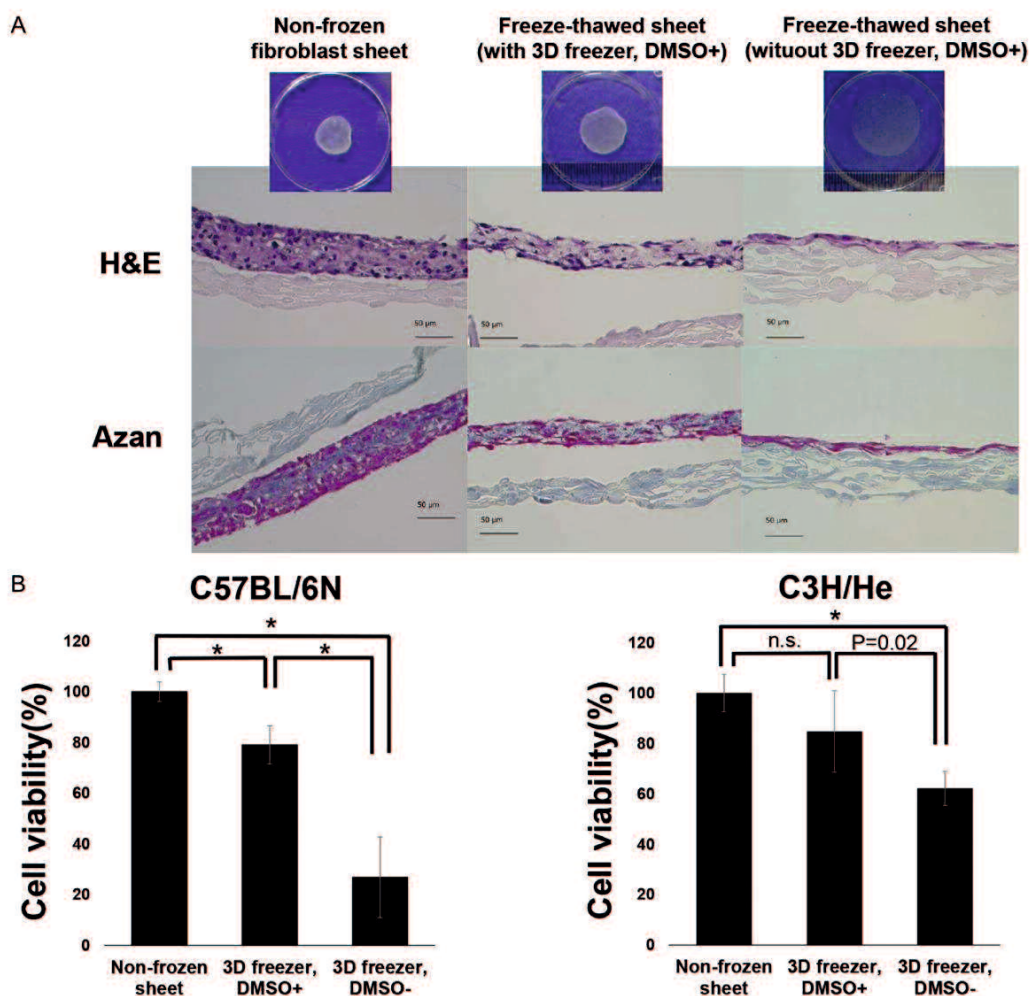
C3H/He マウスの線維芽細胞を、3D フリーザーを使用した場合と使用しない場合の線維芽細胞シートの形態を比較するために、ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む細胞保存液を用いて凍結させた。線維芽細胞を培養皿の底から剥がし、細胞シートとした。非凍結線維芽細胞シートの直径は約 6 mm で、厚さは約 50  $\mu\text{m}$  であった (図 1A)。3D フリーザーを用いて凍結融解した細胞シートの直径は約 7mm、厚さは約 40 $\mu\text{m}$  であった (図 1A)。3D フリーザーを使用しないで凍結融解した細胞シートは収縮せず、非常に薄かった (図 1A)。

C57BL/6 および C3H/He マウスの線維芽細胞を、DMSO を含む細胞保存液および DMSO を含まない細胞保存液で、凍結融解したシートの細胞生存率を解析した。DMSO を含む細胞保存液を用い、3D フリーザーを用いて凍結した両マウス系統の線維芽細胞では、細胞生存率が約 80%であった (図 1B)。DMSO を含まない細胞保存液を用い、3D フリーザーを用いて凍結した C57BL/6 および C3H/He マウスの線維芽細胞では、それぞれ約 26%および 64%の細胞生存率であった。以上の結果から、線維芽細胞シートは DMSO を含む細胞保存液で凍結保存し、その後の実験に使用した。

成長因子 (VEGF、HGF、TGF- $\beta$ 1、SDF-1 $\alpha$ ) の分泌量は、非凍結細胞シートと凍結融解した線維芽細胞の培養上清で測定した。凍結融解した線維芽細胞シートによる成長因子分泌は、非凍結細胞シートで観察された濃度の 47%~86%であった (図 1C)。移植状態での細胞シートの成長因子分泌能を評価するために、作成した細胞シートを培養皿から剥離し浮遊させた状態で、培地を交換して



さらに 3 日間培養し、培養上清の成長因子レベルを測定した。凍結融解した線維芽細胞シートの剥離による成長因子分泌量は、非凍結細胞シートの分泌量の 78%~85%であった (図 1D)。したがって、実際のシート移植の段階では、非凍結シートと凍結融解シートの間でサイトカインの分泌量にほとんど差がないことがわかった。



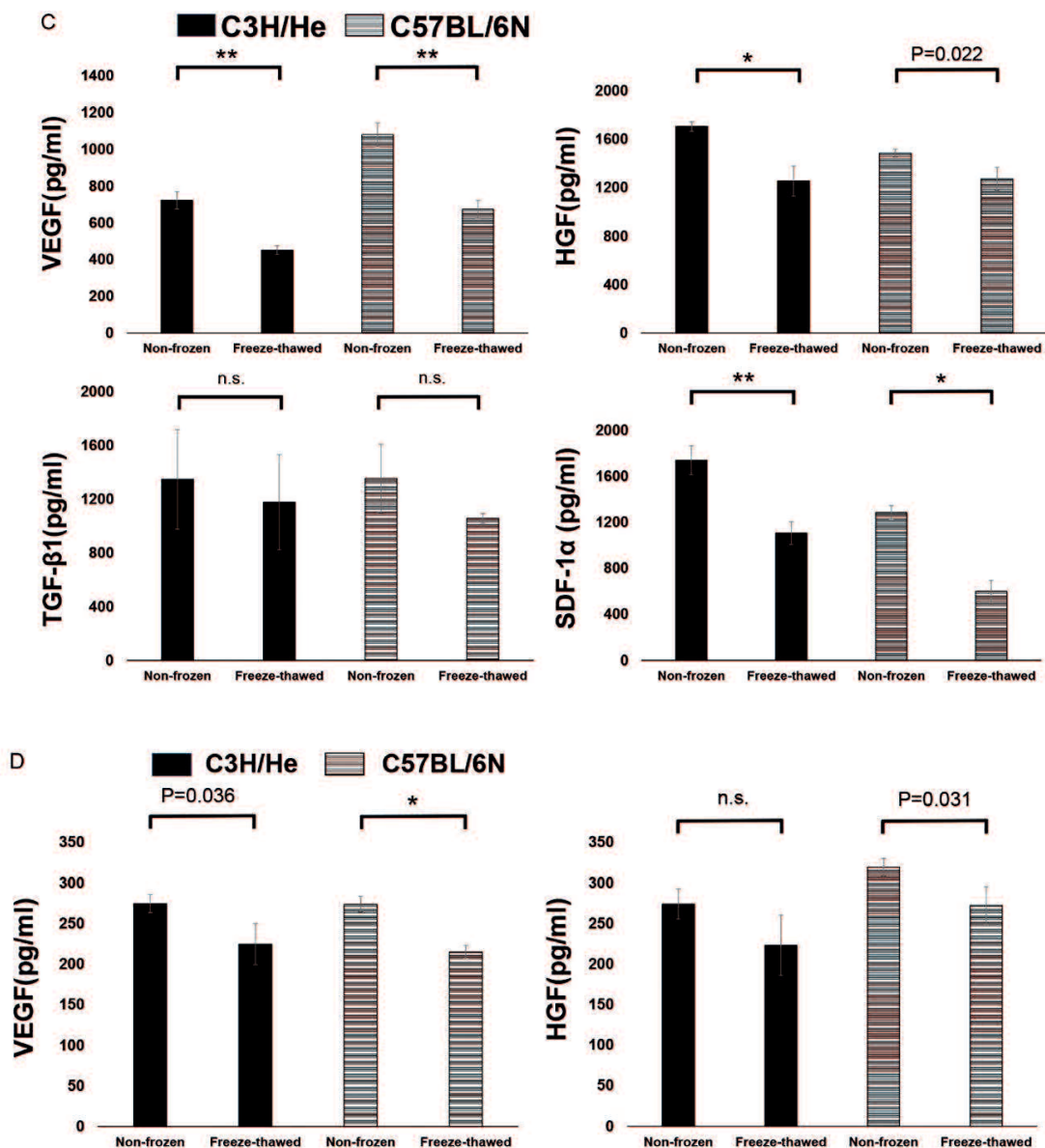


図 1：線維芽細胞シートの組織学的・機能的評価

(A) 非凍結線維芽細胞シート (左)。3D フリーザーを用いて凍結融解した線維芽細胞シート (中)。-80°Cのディープフリーザーのみで凍結融解した線維芽細胞シート (右)。上の画像は、プレートから剥離した線維芽細胞シートのマクロ画像で、下の画像は HE と Azan で染色した病理組織画像 (スケールバー = 50 μm)。

(B) 凍結融解後の線維芽細胞の生存率。生存率は、培地交換 (非凍結線維芽細胞) または解凍 (凍結線維芽細胞) の 48 時間後に Cell Count Reagent SF を用

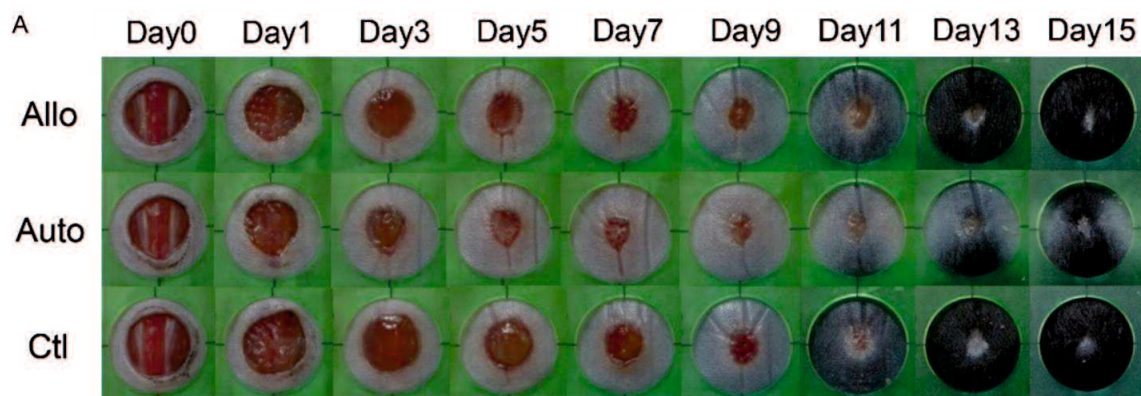
いて評価した (C57BL/6 n = 6, 5, 5、C3H/He n = 6, 5, 6)。

(C) C57BL/6N または C3H/He 由来の線維芽細胞シートの培養上清中のサイトカイン濃度 (各 n = 3)。

(D) 3 日間培養後にプレートから剥離し、培地を交換して 3 日間追加培養した、C57BL/6N または C3H/He 由来の線維芽細胞シートの培養上清中のサイトカイン濃度 (各 n = 3)。

#### 皮膚潰瘍動物モデルにおける非凍結線維芽細胞シートの治療効果

糖尿病 C57BL/6 マウスの背部に、生検パンチで径 6mm の皮膚全層欠損創を作成し、皮膚潰瘍モデルとして使用した。線維芽細胞シートは、C57BL/6 (自家移植) マウスおよび C3H/He (他家移植) マウスから作成した。皮膚潰瘍モデルの創部に非凍結線維芽細胞シートを移植し、0、1、3、5、7、9、11、13、15 日目に創傷治癒効果を評価した (図 2A)。創傷治癒率 (%) は、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、9 日目において、自家または他家線維芽細胞シート移植群でコントロール群より有意に高かった。11 日目、13 日目、15 日目には 3 群間で有意差はなかった (図 2B)。



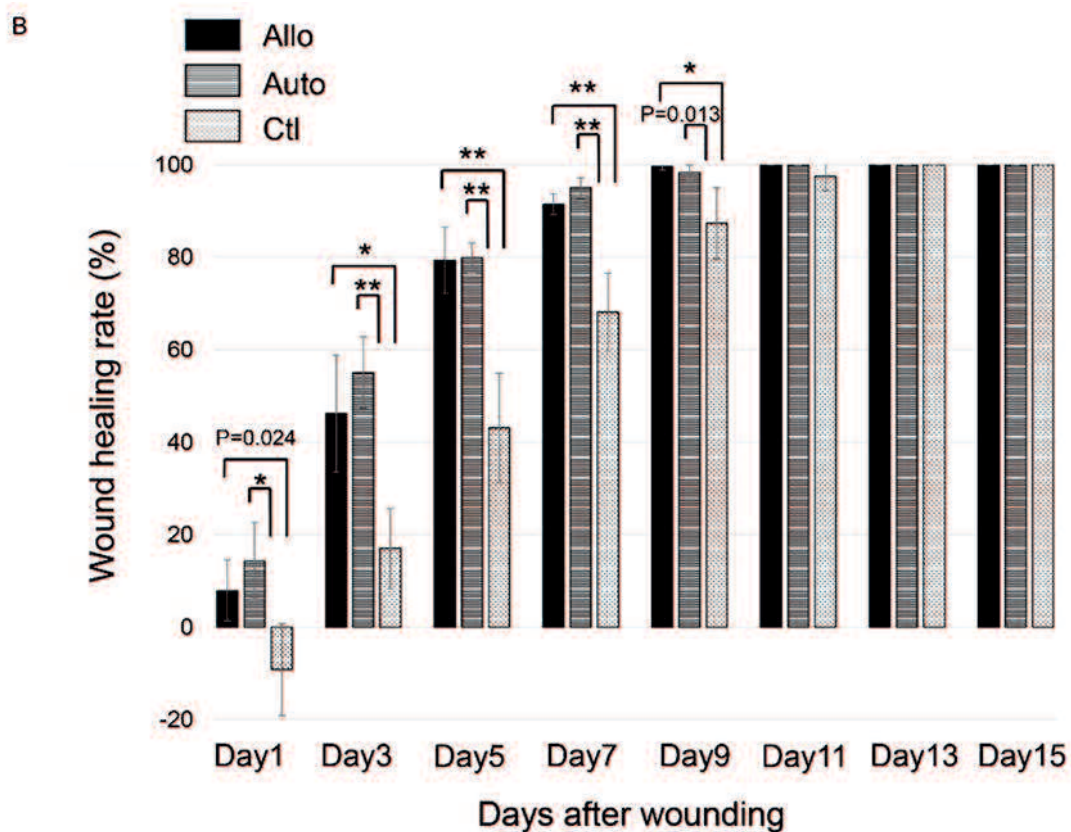


図 2：皮膚創傷治癒モデルにおける非凍結繊維芽細胞シートの治療効果

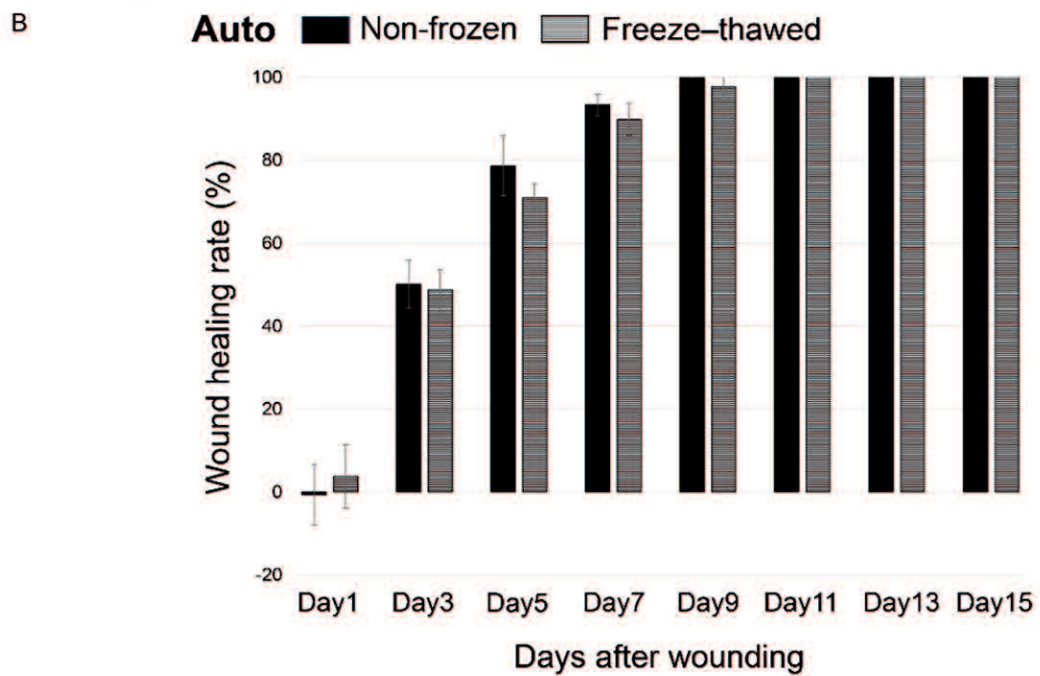
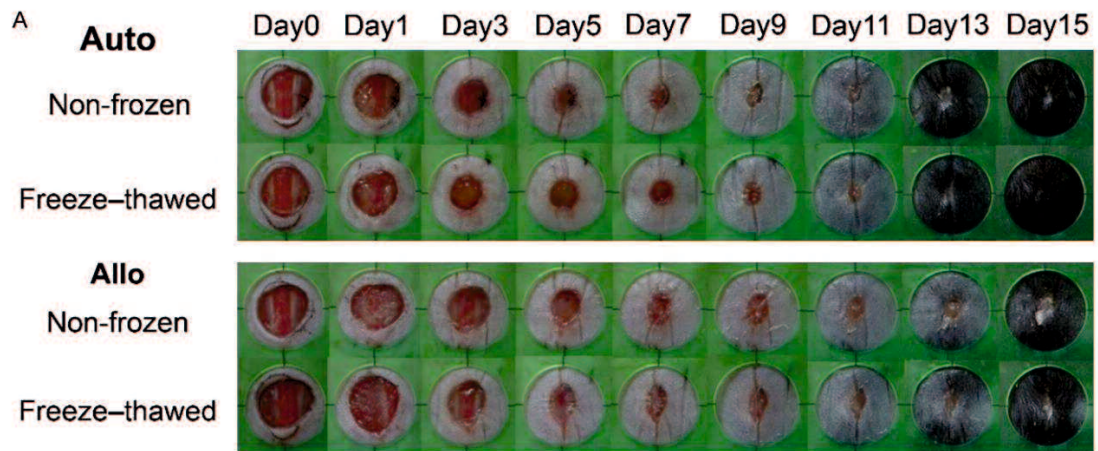
(A) 移植後 0、1、3、5、7、9、11、13、15 日目の創部のマクロ画像。

Auto：非凍結自家細胞シート移植群 (n = 5)、Allo：非凍結他家細胞シート移植群、(n = 5)、Ctl：無治療群 (n = 7)。

(B) 線維芽細胞シート移植後の創傷治癒率を、日数別に 3 群間で統計学的に比較した。

#### 凍結融解した線維芽細胞シートの皮膚創傷治癒動物モデルにおける治療効果

凍結融解した線維芽細胞シートの治療効果を評価するために、非凍結および凍結融解した線維芽細胞シートを皮膚潰瘍モデルに移植した (図 3A)。自家移植と他家移植において、1 日目から 15 日目まで、非凍結線維芽細胞シートと凍結融解した線維芽細胞シートの治療効果に統計的に有意な差は見られなかった (図 3B, C)。



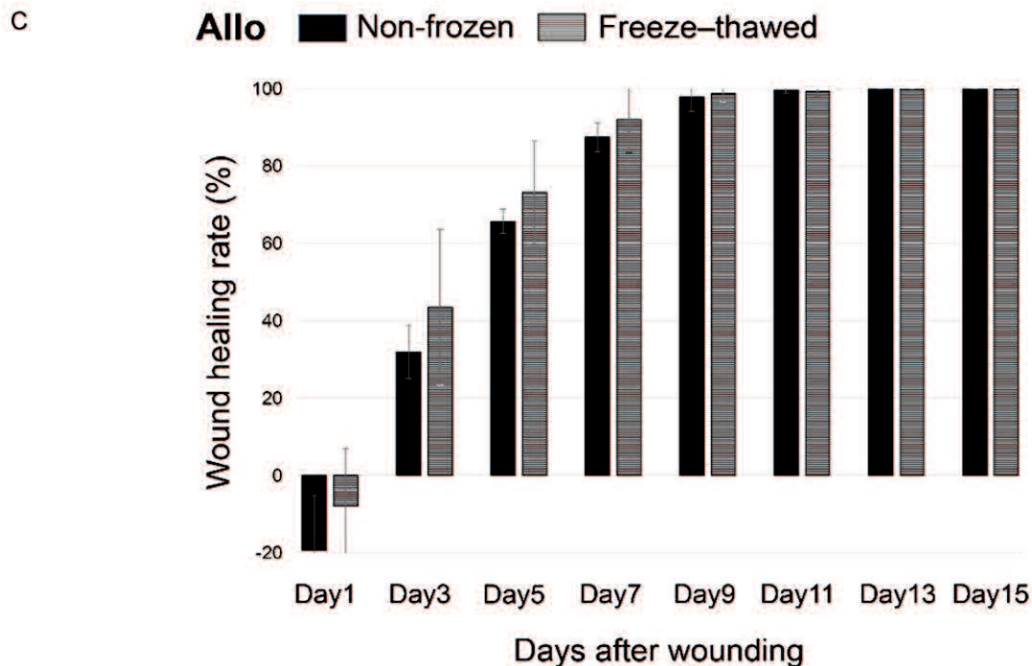


図 3 : 皮膚創傷治癒モデルにおける凍結融解した繊維芽細胞シートの治療効果  
 (A) 移植後 0、1、3、5、7、9、11、13、15 日目の創部のマクロ画像。Auto : 非凍結自家細胞シート移植群 (n = 5)、凍結融解自家細胞シート移植群 (n = 5) ; Allo : 非凍結他家細胞シート移植群 (n = 5)、凍結融解他家細胞シート移植群 (n = 6)。  
 (B) 自家線維芽細胞シート移植後の創傷治癒率を、日数別に 2 群間で統計学的に比較した。  
 (C) 他家線維芽細胞シート移植後の創傷治癒率を、日数別に 2 群間で統計学的に比較した。

#### 細胞シート移植後の創部の病理組織学的検討

細胞シート移植後 15 日目に 4 群 (非凍結自家細胞シート移植群、凍結融解自家細胞シート移植群、非凍結他家細胞シート移植群、凍結融解他家細胞シート移植群) の HE および Azan 染色切片を比較検討した。非凍結自家細胞シート移植群では、紡錘形の核を持つ成熟・分化した線維芽細胞が多数認められ、線維化が進行していた。非凍結自家細胞シート移植群では、他の群に比べ上皮が薄く、創部の慢性炎症が軽減され、創傷治癒期が進行していることが示された。しかし、非凍結他家細胞シート移植群では、非凍結自家細胞シート移植群に比べ細胞密度が高く、線維化が進行していないことから、肉芽組織の存在が示唆され病理

学的には創傷治癒の段階として数日の遅延がみられた。凍結融解自家細胞シート移植群と凍結融解他家細胞シート移植群の病理組織学的所見に有意差はなかった (図 4A)。

$\alpha$  SMA は、筋線維芽細胞[20]および血管周囲細胞[21]のマーカーである。 $\alpha$  SMA 陽性細胞は、移植後 7 日目と 15 日目の 4 群すべての創部で蛍光免疫染色により検出された (図 4B)。7 日目では、紡錘形の  $\alpha$  SMA 陽性細胞が多数認められ、慢性炎症により線維芽細胞が創傷収縮に関与する筋線維芽細胞に分化していることが示された。紡錘形の  $\alpha$  SMA 陽性細胞の数は、自家細胞シート移植群に比べ既に少なくなっており、他家細胞シート移植群では自家細胞シート移植群に比べ組織の再生が遅れていることが示唆された。15 日目には、非凍結自家細胞シート移植群、凍結融解自家細胞シート移植群、凍結融解他家細胞シート移植群において、 $\alpha$  SMA 陽性細胞のほとんどが微小血管を表すと思われる管腔構造を形成していた。しかし、非凍結他家細胞シート移植群では、15 日目に筋線維芽細胞と思われる紡錘形の  $\alpha$  SMA 陽性細胞が多く見られた。このことから、非凍結他家細胞シート移植群では慢性炎症が長期化し、創傷治癒が遅延していることが示唆された。組織再生における血管新生を評価するために、15 日目の 4 群において、蛍光免疫染色により CD31 陽性細胞を検出した (図 4C)。15 日目の微小血管密度には、各群間に有意差はなかった (図 4D)。

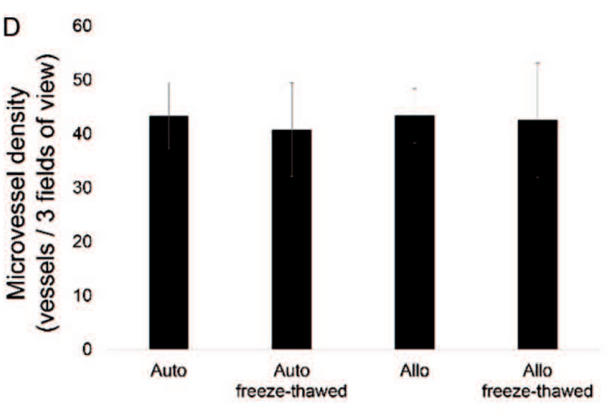
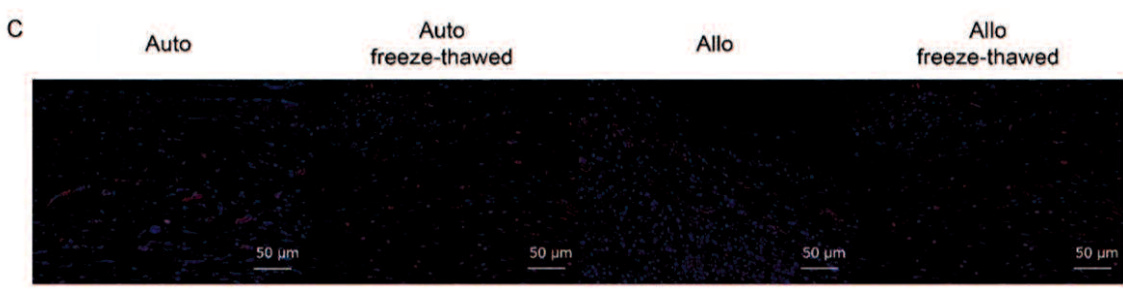
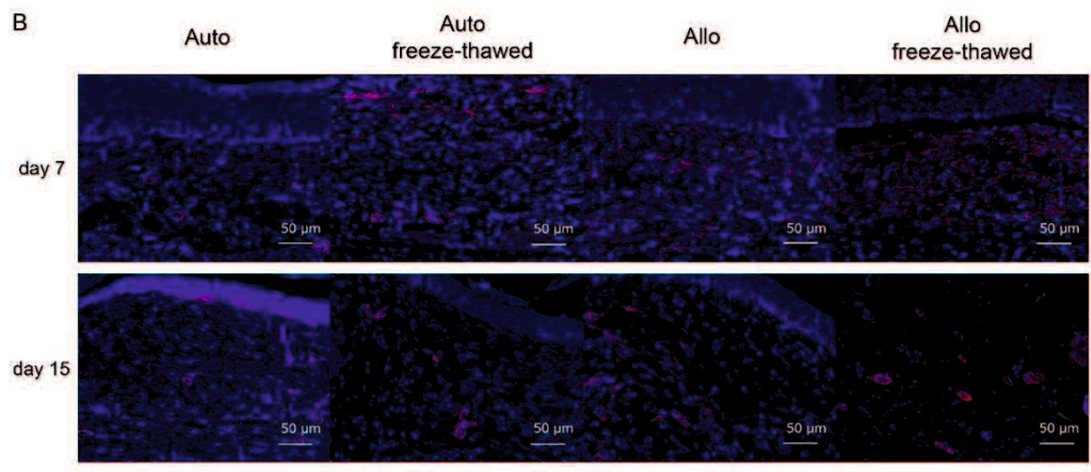
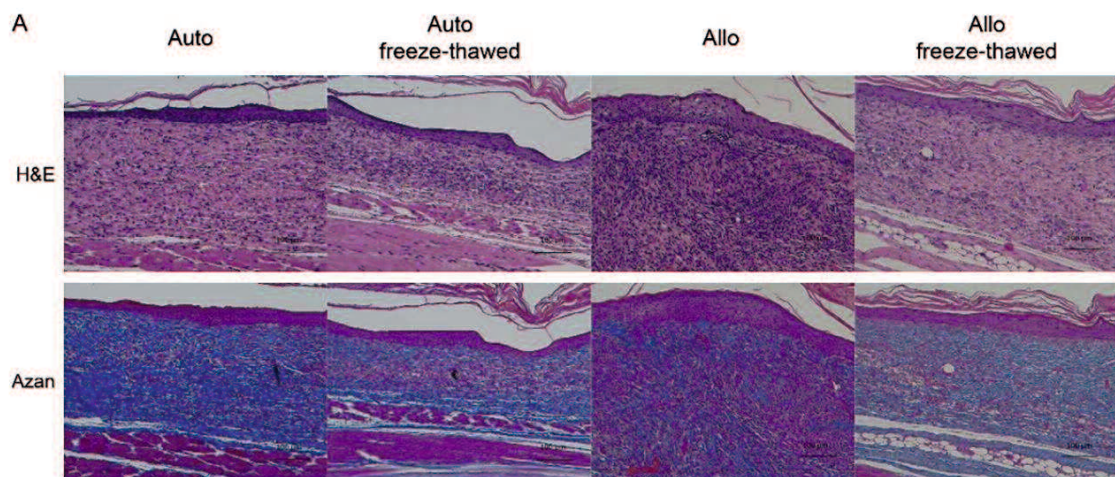




図 4 : 細胞シート移植後の創部の病理学的解析と免疫蛍光染色の結果

(A) 移植後 15 日目の創部の代表的な HE および Azan 染色切片。20 倍率。スケールバー=100  $\mu$  m。

(B) 移植後 7 日目および 15 日目の創部における蛍光免疫染色。  $\alpha$  SMA 陽性細胞 ( $\alpha$  SMA : 赤色) および核 (DAPI : 青色)。スケールバー=50  $\mu$  m。 DAPI : 4' , 6-diamidino-2-phenylindole。

(C) 移植後 15 日目の創部における蛍光免疫染色。内皮細胞 (CD31 : 赤) および核 (DAPI : 青)。スケールバー=50  $\mu$  m。

(D) 移植後 15 日目の肉芽組織の 3 視野あたりの微小血管密度( $n = 3, 4, 4, 4$ )。

マクロファージのマーカである F4/80 陽性細胞は、15 日目の創部全体に蛍光免疫染色で多数検出されたが (図 5A)、群間で有意差はなかった。T リンパ球のマーカである CD3 陽性細胞は、15 日目に 4 群すべての創部で蛍光免疫染色により検出された (図 5B)。非凍結他家細胞シート移植群では、非凍結自家細胞シート移植群および凍結融解自家細胞シート移植群に比べ有意に多くの CD3 陽性細胞が見られた (図 5C)。また、凍結融解他家細胞シート移植群では、非凍結自家細胞シート移植群および凍結融解自家細胞シート移植群と比較して、CD3 陽性細胞数が有意に多かった (図 5C)。CD3 陽性細胞数は、非凍結他家細胞シート移植群と凍結融解他家細胞シート移植群の間に有意差はなかった (図 5c)。

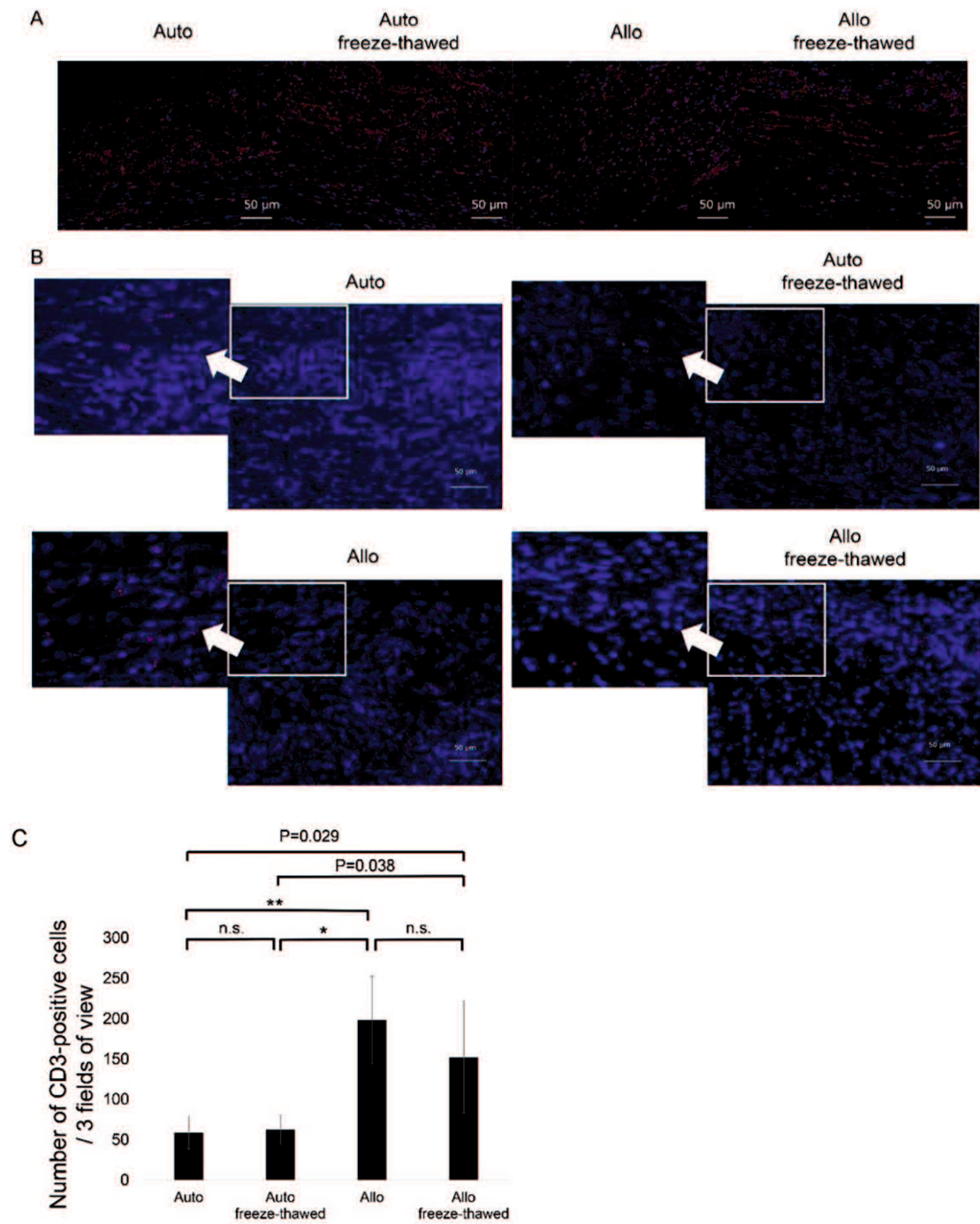


図 5： 創部の免疫蛍光染色

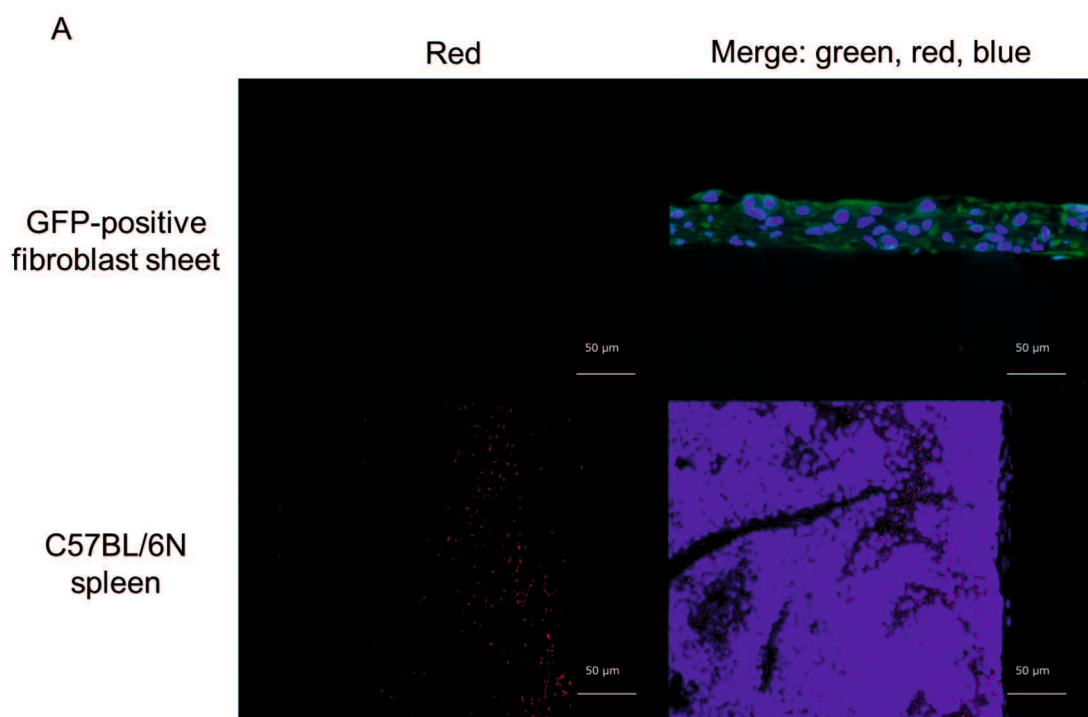
(A) 移植後 15 日目の創部における F4/80 陽性細胞の検出。マクロファージ (F4/80 : 赤)、核 (DAPI : 青)。スケールバー = 50  $\mu$  m。

(B) 移植後 15 日目の創部における CD3 陽性細胞の検出。T リンパ球 (CD3 : 赤)、核 (DAPI : 青)。スケールバー = 50  $\mu$  m。

(C) 移植後 15 日目の創部における 3 視野あたりの CD3 陽性細胞の数 (n = 5, 5, 5, 6)。

#### 線維芽細胞あるいは線維芽細胞シートにおける MHC の発現

C57BL/6 GFP トランスジェニックマウスの尾部より線維芽細胞を分離し、移植した凍結融解線維芽細胞シートが皮膚創傷治癒動物モデルでどの程度残存するかを調べるために、蛍光免疫染色により GFP および MHC class II 発現を解析した (図 6A)。GFP 陽性線維芽細胞シートは GFP を発現していたが、MHC クラス II は発現していなかった。GFP 陽性線維芽細胞シートを凍結融解し、皮膚潰瘍動物モデルに移植し、15 日間観察した (図 6B)。7 日目までは GFP 陽性シート状の構造が観察され、その後は GFP 陽性細胞は見られるものの、徐々にシート構造は崩壊していった。凍結融解した GFP 陽性線維芽細胞シートを移植後、15 日目まで MHC class II の発現をモニターした。MHC class II の発現は、1 日目には GFP 陽性細胞にのみ検出されたが、3 日目以降は検出されなかった (図 6C)。



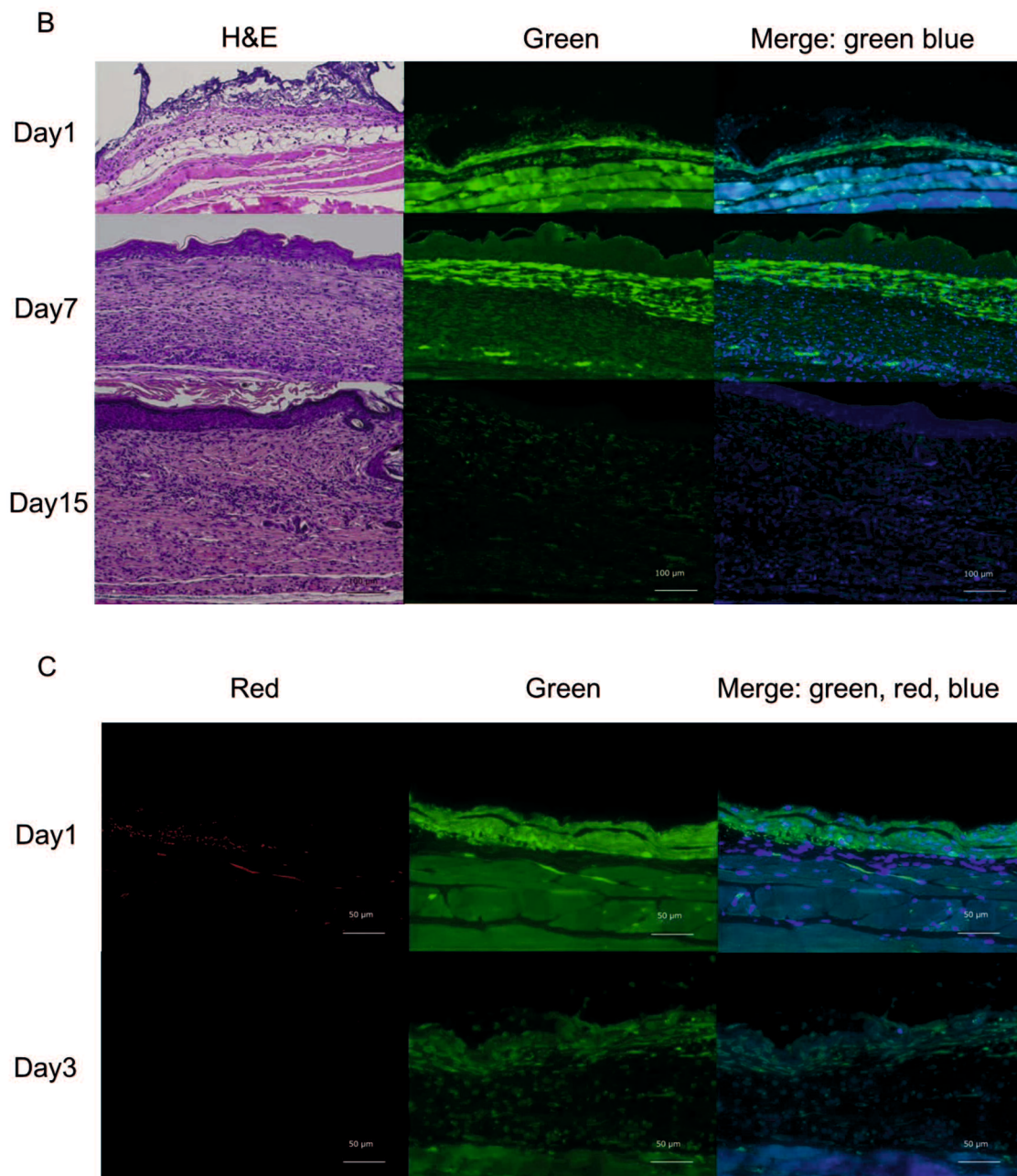


図 6 : 移植した細胞シートが創部に残存する期間と MHC class II の発現

(A) C57BL/6 マウスの GFP 陽性線維芽細胞シートと脾臓に対して免疫蛍光染色を行った。GFP (緑)、MHC class II (赤)、核 (DAPI : 青)。

(B) GFP 陽性線維芽細胞シートを皮膚潰瘍モデルへ移植した後の GFP 陽性細胞の検出。GFP 陽性細胞は、移植後 1 日目、7 日目、15 日目のいずれも観察された。スケールバー = 100 μ m。

(C) 創部における GFP 陽性線維芽細胞シートの MHC class II 発現の検出。

GFP 陽性細胞における MHC class II の発現を移植後 1 日目と 3 日目に観察した。スケールバー=50  $\mu$  m。

## 6. 考察

これまでに、単層細胞シートが動物モデルの虚血心[7, 8]や皮膚潰瘍[12, 13]に有用な材料であることを報告してきた。しかし、単層細胞シートを臨床応用するにはシートの取り扱いが困難であった。そこで、我々は革新的な積層化細胞シートを開発し、多層化した線維芽細胞シートの移植が皮膚潰瘍の治癒を促進すること[14-16]、線維芽細胞シート移植が気管支断端漏[22]や腓液瘻[23]などの、術後合併症予防に有用であることを報告した。また、臨床研究では、自家細胞の機能が患者依存的に低下する可能性があることを示した[15]。我々は、細胞シート移植を必要とする全ての患者に対して、他家細胞シートの開発が必須であると考え、皮膚潰瘍モデルマウスにおいて、非凍結他家線維芽細胞シートが非凍結自家線維芽細胞シートと同等の治療効果を有することを報告した[16]。本研究では、創傷治癒の遅延を示す糖尿病モデルマウスを細胞シート移植先として、線維芽細胞シートの治療効果を実証した (図 2B)。

細胞シートの凍結保存は、細胞シート移植の普及に不可欠なコスト削減と利便性の向上に寄与する。通常の細胞培養では、緩慢凍結法[24]とガラス化凍結法[25]の 2 つの凍結方法が用いられている。我々は、大量生産と環境安全性の観点から、緩慢凍結法を選択するのが良いと考えた。そこで、3 次元構造を持つ細胞シートを凍結するための装置として、3D フリーザーが有用であると考えた。我々は以前、3D フリーザーを用いて凍結融解した線維芽細胞シートの細胞生存率が 80%以上であることを報告したが[17]、本研究では 80%程度であった (図 1B)。細胞シートを個々の細胞に分解することは困難であるため、細胞数ではなく試薬を用いた細胞内代謝によって細胞生存率を評価したが、この結果は細胞生存率が 70%以上であるべきという推奨基準を満たすものであった (<https://www.fda.gov/media/73624/download>)。

HGF と TGF- $\beta$ 1 は、他家間葉系幹細胞の免疫寛容に重要な役割を担っている[26]。凍結融解した線維芽細胞から HGF と TGF- $\beta$ 1 が分泌されていることから (図 1C)、凍結融解した他家線維芽細胞シートによる創傷治癒を促進するだけでなく、移植部位の他家線維芽細胞に対する免疫寛容を一時的に誘導する可能性も示唆された。血管新生を促進する VEGF や SDF-1 $\alpha$  の分泌量は、非凍

結シートと凍結融解シートの間で差があったが、創傷の病理組織学的解析では CD31 陽性細胞からなる微小血管の数に有意差はなかった (図 4D)。剥離した線維芽細胞シートと比較すると、非凍結シートと凍結融解シートの間でサイトカイン分泌量にほとんど差はなかった (図 1D)。また、非凍結シートと凍結融解シートの生細胞の比率を考慮すると、1 細胞あたりの生細胞数は同等と考えられた (図 1B)。これらから、自家・他家線維芽細胞シートともに、非凍結シートと凍結融解シートの創傷治癒率に有意差はなかったと考えられた (図 3B, C)。他家移植群では、創傷治癒率に有意差はなかったが、凍結融解シートは非凍結シートに比べて移植後の組織炎症により組織再生が急速に進行し、15 日目に非凍結シートでは凍結融解シートに比べて紡錘形の  $\alpha$  SMA 陽性細胞の減少が認められた (図 4B,C)。非凍結自家線維芽細胞シート群と凍結融解した自家線維芽細胞シート群の間に差はなかったが、移植後 15 日目の CD3 陽性細胞数は自家線維芽細胞シート群に比べ非凍結他家線維芽細胞シート群および凍結融解した他家線維芽細胞シート群で多かった (図 4D)。しかし、凍結融解した他家線維芽細胞シート群の組織再生は、非凍結他家線維芽細胞シート群よりも凍結融解した自家線維芽細胞シート群と同等であった (図 4A)。通常 SDF-1 $\alpha$  は創部の新生血管を増加させ、創傷治癒を促進する [27] とともに、リンパ球の強力な誘導因子であり、SDF-1 $\alpha$  分泌量の違いが非凍結他家移植群で認められた慢性炎症の遷延に寄与したと推察された。非凍結他家線維芽細胞シート群における慢性炎症による創傷治癒期の遅延は、創部に筋線維芽細胞が多く認められることから推察される (図 4C)。

移植した線維芽細胞シートは移植部位から消失し [12, 16]、GFP 陽性線維芽細胞シートは治癒した組織に取り込まれなかったことから、治療メカニズムは移植細胞から分泌される成長因子によるパラクライン効果であると推測される (図 6B)。これは、凍結融解した他家線維芽細胞シートから HGF や TGF- $\beta$  1 が分泌されることにより、激しい免疫拒絶反応が回避された可能性があり、移植シートが傷口に留まる期間が自家と他家線維芽細胞シートでほぼ同じであったことが示唆された。間葉系幹細胞は、低酸素や炎症部位に移植されると、MHC class II を発現して免疫特権を維持することが報告されている [28, 29]。MHC class II の発現は、移植 1 日目には凍結融解した GFP 陽性線維芽細胞シートの一部で検出されたものの、3 日目以降は観察されなかった (図 6C)。HGF や TGF- $\beta$  1 による免疫寛容に加えて、MHC class II の特性により細胞シートの生存率

や生存性が延長され、免疫反応や創部の慢性炎症の程度に違いがあっても創傷治癒率に差がなかったのは、このためと思われた。

## 7. 結語

以上から、3Dフリーザーを用いて作製した凍結融解した線維芽細胞シートが、in vivo モデルにおいて非凍結の線維芽細胞シートと同等の治療効果を有することを初めて報告した。他家線維芽細胞シートの凍結保存法が確立することで、大幅なコスト削減と利便性の向上が得られ、再生医療の普及に貢献する可能性がある。

## 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）、濱野公一教授に深謝申し上げます。また、実験指導を頂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] Powers JG, Higham C, Broussard K and Phillips TJ. Wound healing and treating wounds Chronic wound care and management. J Am Acad Dermatol 2016; 74:607-625.
- [2] Andersen JC, Leong B V., Gabel JA, Murga AG, Patel ST, Abou-Zamzam AM, Teruya TH and Bianchi C. Conservative management of non-infected diabetic foot ulcers achieves reliable wound healing and limb salvage in the setting of mild-moderate ischemia. Ann Vasc Surg 2022 in press.
- [3] Suehiro K, Morikage N, Harada T, Samura M, Takeuchi Y, Mizoguchi T and Hamano K. Self-care-based treatment using ordinary elastic bandages for venous leg ulcers. Ann Vasc Dis 2017; 10:229-233.
- [4] Suehiro K, Fujita M, Morikage N, Harada T, Samura M, Suzuki R, Kurazumi H, Tsuruta R and Hamano K. Hyperbaric oxygen therapy is an effective adjunctive therapy to manage treatment-resistant venous leg ulcers. Ann Vasc Dis 2021; 14:273-276.
- [5] Seidel D, Storck M, Lawall H, Wozniak G, Mauckner P, Hochlenert D,

- Wetzel-Roth W, Sondern K, Hahn M, Rothenaicher G, Krönert T, Zink K and Neugebauer E. Negative pressure wound therapy compared with standard moist wound care on diabetic foot ulcers in real-life clinical practice: Results of the German DiaFu-RCT. *BMJ Open* 2020; 10:1-16.
- [6]Yang J, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Kanzaki M, Sekine H, Shimizu T and Okano T. Cell delivery in regenerative medicine: The cell sheet engineering approach. *J Control Release* 2006; 116:193-203.
- [7]Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K, Mikamo A, Yoshimura K, Li TS and Hamano K. Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart. *Am J Transl Res* 2015; 7:2738-2751.
- [8]Tanaka Y, Shirasawa B, Takeuchi Y, Kawamura D, Nakamura T, Samura M, Nishimoto A, Ueno K, Morikage N, Hosoyama T and Hamano K. Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model. *Am J Transl Res* 2016; 8:2222-2233.
- [9]Fujita A, Ueno K, Saito T, Yanagihara M, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A and Hamano K. Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction. *Eur J Cardio-Thoracic Surg* 2019; 56:1062-1074.
- [10]Esato K, Hamano K, Li TS, Furutani A, Seyama A, Takenaka H and Zenpo N. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002; 56:747-752.
- [11]Samura M, Hosoyama T, Takeuchi Y, Ueno K, Morikage N and Hamano K. Therapeutic strategies for cell-based neovascularization in critical limb ischemia. *J Transl Med* 2017; 15:1-10.
- [12]Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Murata T, Hosoyama T and Hamano K. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep* 2016; 6:1-9.
- [13]Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Oga A, Murata T, Hosoyama T, Morikage N and Hamano K. Ulcer healing effect of



autologous mixed sheets consisting of fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells in rabbit ischemic hind limb. *Am J Transl Res* 2017; 9:2340-2351.

- [14] Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T, Hosoyama T, Morikage N and Hamano K. Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Cell Physiol Biochem* 2018; 47:201-211.
- [15] Mizoguchi T, Suehiro K, Ueno K, Ike S, Nagase T, Samura M, Harada T, Kurazumi H, Suzuki R, Harada K, Takami T, Morikage N and Hamano K. A pilot study using cell-mixed sheets of autologous fibroblast cells and peripheral blood mononuclear cells to treat refractory cutaneous ulcers. *Am J Transl Res* 2021; 13:9495-9504.
- [16] Nagase T, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Suehiro K, Shirasawa B, Morikage N and Hamano K. Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice. *Am J Transl Res* 2020; 12:2652-2663.
- [17] Ueno K, Ike S, Yamamoto N, Matsuno Y, Kurazumi H, Suzuki R, Katsura S, Shirasawa B and Hamano K. Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing. *Biochem Biophys Reports* 2021; 28:101169.
- [18] Kashiyama N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura T, Kawamura A, Yoshida S, Harada A, Watabe T, Kanai Y, Toda K, Hatazawa J and Sawa Y. Development of PET imaging to visualize activated macrophages accumulated in the transplanted iPSc-derived cardiac myocytes of allogeneic origin for detecting the immune rejection of allogeneic cell transplants in mice. *PLoS One* 2016; 11:1-18.
- [19] Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y. "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997; 407:313-319.
- [20] Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C and Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001; 159:1009-1020.
- [21] Crisan M, Corselli M, Chen WCW and Péault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 2012; 16:2851-2860.

- [22]Yoshimine S, Ueno K, Murakami J, Saito T, Suzuki R, Asai Y, Ikeda E, Tanaka T and Hamano K. Autologous multilayered fibroblast sheets can reinforce bronchial stump in a rat model. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2022; 34:349-358.
- [23]Iwamoto K, Saito T, Takemoto Y, Ueno K, Yanagihara M, Furuya-Kondo T, Kurazumi H, Tanaka Y, Taura Y, Harada E and Hamano K. Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis. *Am J Transl Res* 2021; 13:1257-1268.
- [24]Oegema TR, Deloria LB, Fedewa MM, Bischof JC and Lewis JL. A simple cryopreservation method for the maintenance of cell viability and mechanical integrity of a cultured cartilage analog. *Cryobiology* 2000; 40:370-375.
- [25]Ohkawara H, Miyagawa S, Fukushima S, Yajima S, Saito A, Nagashima H and Sawa Y. Development of a vitrification method for preserving human myoblast cell sheets for myocardial regeneration therapy. *BMC Biotechnol* 2018; 18:56.
- [26]Kot M, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Musiał-Wysocka A, Suda-Szczurek M and Majka M. The importance of HLA assessment in “off-the-shelf” allogeneic mesenchymal stem cells based-therapies. *Int J Mol Sci* 2019; 20:5680.
- [27]Feng G, Hao D and Chai J. Processing of CXCL12 impedes the recruitment of endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. *FEBS J* 2014; 281:5054-5062.
- [28]Ilangumaran S, Finan D, La Rose J, Raine J, Silverstein A, De Sepulveda P and Rottapel R. A positive regulatory role for suppressor of cytokine signaling 1 in IFN- $\gamma$ -induced MHC class II expression in fibroblasts. *J Immunol* 2002; 169:5010-5020.
- [29]Abu-El-Rub E, Sareen N, Lester Sequiera G, Ammar HI, Yan W, ShamsEldeen AM, Rubinchik I, Moudgil M, Shokry HS, Rashed LA and Dhingra S. Hypoxia-induced increase in Sug1 leads to poor post-transplantation survival of allogeneic mesenchymal stem cells. *FASEB J* 2020; 34:12860-12876.