

**Dry preserved multilayered fibroblast cell sheets
are a new manageable tool for regenerative medicine
to promote wound healing**

(乾燥積層線維芽細胞シートは創傷治癒を促す再生医療において新たな扱いやすい被覆材である)

氏名 松野 祐太郎

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 9 月

目次

| | |
|----------|----|
| 1. 要旨 | 3 |
| 2. 研究の背景 | 4 |
| 3. 目的 | 6 |
| 4. 方法 | 6 |
| 5. 結果 | 11 |
| 6. 考察 | 27 |
| 7. 結語 | 31 |
| 8. 謝辞 | 31 |
| 9. 参考文献 | 32 |
| 10. 補足図 | 36 |

1. 要旨

細胞シート移植治療の普及には利便性の高い細胞シートの保存方法の開発が不可欠である。細胞シートから分泌される成長因子によって創傷治癒は促進されると考えられてきたため、その保存には細胞生存率が重要視されてきた。そのため、積層線維芽細胞シートの乾燥保存に関する検討はこれまでにない。本研究では、乾燥保存した積層線維芽細胞シート（Dryシート）を開発し、糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルでの創傷治癒促進効果を検証した。

マウスの尾から単離した線維芽細胞を用いて、積層線維芽細胞シート（Livingシート）を作製した。Livingシートを風乾させ、Dryシートとした。Livingシートに凍結解凍操作を繰り返してFreeze-thaw（FT）シートとした。各シートを培地に浸漬して溶出液とし、各溶出液中の成長因子を測定した。Vascular endothelial growth factor（VEGF）とhepatocyte growth factor（HGF）はDryシートとLivingシートで検出したのに対し、fibroblast growth factor-2（FGF-2）とhigh mobility group box 1（HMGB1）はDryシートのみで検出した。FTシートではこれらの成長因子をほとんど検出しなかった。細胞シートの溶出液を添加して線維芽細胞を培養し、溶出液の生理活性を線維芽細胞増殖試験で検討した。DryシートはLivingシートと比べ、細胞増殖と成長因子産生量を有意に促進し、FGF-2中和抗体で阻害すると、この細胞増殖反応は抑制された。糖尿病マウス全層皮膚欠損モデル（C57BL/6N）において、自家及び他家（C3H/He）の線維芽細胞から作製したDryシート貼付群は無治療群に比べ、創の閉鎖を有意に促進した。Dryシートは常温（23℃）よりも冷蔵（4℃）での保存安定性に優れ、少なくとも4週間の冷蔵保存ではDryシートのFGF-2の減少を認めなかった。

以上から、DryシートはFGF-2の放出という新たな作用機序で創傷治癒を促進することが明らかになった。他家細胞から作製されたDryシートは、創傷治癒を促す再生医療において新たな扱いやすい被覆材であることが示唆された。

2. 研究の背景

近年、移植細胞の組織生着性を向上させる方法として“細胞シート技術”が開発され[1]、虚血性心筋症、術後肺気漏、内視鏡的食道粘膜下層剥離術後の狭窄などの様々な疾患や術後合併症予防に対する細胞シート移植治療の研究開発が行われている[2-4]。我々は難治性皮膚潰瘍の治療に同技術が応用できると考え、線維芽細胞と末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cells: PBMNCs）から成る細胞混合シートを独自に開発した。細胞混合シートは、PBMNCs との共培養と低酸素プレコンディショニングとの相乗効果によって、線維芽細胞から分泌される血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）の増強が特徴である[5,6]。細胞シート移植治療効果の作用機序の一つは成長因子やサイトカインの産生によるパラクライン効果である。我々は細胞混合シートの貼付がマウスやウサギの皮膚潰瘍モデルにおいて、創傷治癒を促進することを明らかにした[5,6]。また、積層化した細胞シートの簡便な作製法を開発し、自家積層細胞混合シートの貼付がマウス皮膚潰瘍モデルにおいて有効であることを報告した[7]。さらに、我々は山口大学医学部附属病院において「難治性皮膚潰瘍に対する培養ヒト自己細胞混合シートを用いた移植治療に関する臨床試験（第 I 相試験）」を実施し、末梢血単核球とヒト口腔組織由来線維芽細胞を共培養した自家積層細胞混合シートの下肢皮膚潰瘍部への移植において、個々の症例に対する評価で安全性と創傷治癒促進効果を認めた[8]。しかし、6 例中 3 例では移植治療に至らなかった。その理由は、1 例は線維芽細胞の増殖不良のためであり、また 2 例は線維芽細胞の VEGF 産生能が低く、移植の基準を満たさなかったためであった[8]。自家細胞を用いた同臨床試験から、患者自身の線維芽細胞の機能低下が高率にみられることが明らかになった。また、自家細胞を用いた細胞シート移植治療は理想的な治療法ではあるが、広く臨床に普及させるためには、安定供給が可能となる他家細胞から作製した細胞シートが必要である。細胞混合シートは線維芽細胞の成長因子分泌能の強化を目的に自己の PBMNCs を用いたが、細胞シートの積層化技術によって線維芽細胞単独でもその機能を十分に高めることができ、マウス皮膚潰瘍モデルにおいて積層線維芽細胞シート貼付群と積層細胞混合シート貼付群との間で、その効果にほとんど差はみられなかった[7]。我々は、積層線維芽細胞シートから十分な成長因子が分泌されること、並びにマウス皮膚潰瘍モデルにおいて他家積層線維芽細胞シートの貼付による創傷治癒促進効果は自家積

層線維芽細胞シートと同等であることを確認した[9]。他家細胞シートの貼付は、多少の局所免疫が生じるものの、創傷治癒に悪影響を与えることはなかった[9]。このように、細胞シート移植治療の臨床応用を見据えると、安定供給可能な他家細胞から作製した細胞シートが最善のアプローチと考えられる。

細胞シート移植治療の利便性の向上と普及には、簡便に使用できる細胞シート保存方法の開発が不可欠である。選択肢の一つとして、凍結解凍操作によって脱細胞化を生じさせ、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) のみを保持した ECM シートが開発されている[10]。ECM シートは、保存安定性に問題はなく、移植後の免疫反応が少ないという利点があり、移植時には細胞の足場として機能するとされる[10,11]。しかし、ECM シートは凍結解凍操作によって引き起こされる細胞の損傷のため、生理活性物質をほとんど保持していない。他の利便性に優れた方法として、乾燥保存がある。これまでに、凍結乾燥した表皮細胞シート[12,13]や乾燥保存した羊膜シート[14,15]の研究の報告はあるものの、乾燥保存した線維芽細胞シートの報告はない。そこで本研究では、乾燥保存した積層線維芽細胞シート (Dry シート) を開発し、他家細胞由来の Dry シートを用いて、マウス皮膚潰瘍モデルにおける創傷治癒効果を検討することを目的とした。Dry シートの有効性を検証するために、凍結解凍操作により生理活性物質を含まない Freeze-thaw (FT) シート、また従来積層線維芽細胞シート (Living シート) を用いて比較検討した。低酸素プレコンディショニングは線維芽細胞の分泌能の向上に有効であり[5,6]、本研究で用いたすべての細胞シート (Living シート、Dry シート、FT シート) は低酸素プレコンディショニングを施行している[7]。In vivo での検討前に、Dry シートの創傷治癒におけるメカニズムを検証するため、Dry シートを浸漬させた培養液中に成長因子が放出されることを確認した。Dry シートは、Living シートのように VEGF や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) などの血管新生因子を産生することは期待できない。しかし、乾燥によって細胞膜は損傷を受け、細胞シートを再水和させた時に細胞シート内に保持された物質が放出されると考えられる。本研究では、損傷した細胞から放出され、かつ、創傷治癒に関与すると報告されている線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2: FGF-2) [16-20]と高移動度グルーブボックス蛋白質 1 (high mobility group box protein1: HMGB1) [21-26]に着目した。これらの成長因子が Dry シートから放出されるのか、また、生理活性を有するのか否か検討した。

3. 目的

本研究の目的は、乾燥保存した積層線維芽細胞シート（Dry シート）を作製し、他家細胞由来の Dry シートを用いて、マウス皮膚潰瘍モデルにおける創傷治癒促進効果を検討することである。

4. 方法

倫理宣言

本研究におけるすべての実験は、関連するガイドラインおよび規則に従って実施した。動物実験は、山口大学の動物実験倫理委員会の承認の下、ARRIVE ガイドラインに則り実施した (#31-093)。

使用動物

雄の C57BL/6N および C3H/He マウス（6 週齢）を日本エスエルシー株式会社より購入した。これらのマウスは、温度（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ）、湿度（ $70 \pm 20\%$ ）および明暗環境（12 時間明暗サイクル）を制御した室内で、餌と水を自由に摂取できるように飼育した。

細胞シートの作製

積層線維芽細胞シート（Living シート）：雄のマウス尻尾由来皮膚を採取し、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、10% fetal bovine serum（FBS; Thermo Fisher Scientific 社）を含む CTS™ AIM-V 培地（Thermo Fisher Scientific 社）で培養した。CTS™ AIM-V 培地と HFDM-1 (+)培地（細胞科学研究所）に 5% FBS を加えた培地 2 mL を用いて、初代線維芽細胞をポリスチレン製の 24-well プレート（1.88 cm^2/well : AGC テクノグラス社）で 4.2×10^5 cells/well となるように播種し、大気酸素条件下（ 37°C , 5% CO_2 , 20% O_2 ）で 2 日間培養後に、低酸素条件下（ 33°C , 5% CO_2 , 2% O_2 ）で 1 日培養（低酸素プレコンディショニング）し、積層線維芽細胞シートを作製した[5-7]。培養後、細胞シートを 2 mL のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で 2 回洗浄し、500 μL のディスパーゼ溶液（10 PU/mL、富士フィルム和光純薬株式会社）を加えて、大気酸素条件下（ 37°C , 5% CO_2 , 20% O_2 ）で 30 分間インキュベーションした。PBS で 2 回洗浄した

後、細胞シートを剥離し、これらを本研究において Living シートとして使用した。

乾燥細胞シート (Dry シート) : バイオクリーンベンチ (CCV-1300E、日立製作所) 内の清潔操作が保たれる範囲において、風乾で乾燥を行った。1,000 μ L のチップを用いて Living シートをシリコン製台座上に展開し、30 分間静置した。乾燥させた細胞シート (Dry シート) をピンセットでシリコン製台座から剥がし、1.5 mL マイクロチューブに移した。Dry シートは乾燥剤とともに室温 (23°C) で保存し、作製後 1 週間以内に *in vivo* の移植実験に使用した。保存安定性の検証実験では、Dry シートを乾燥剤とともに冷蔵 (4°C) または室温 (23°C) で保存した。

凍結解凍シート (Freeze-thaw sheet : FT シート) : Living シートを剥離後、24-well プレートで密閉できるビニール袋内に移し、ディープフリーザー (-80°C) で 60 分間凍結した後、ふ卵器 (37°C) で 90 分間解凍した。凍結解凍操作を 3 回繰り返し、PBS 2 mL で 2 回洗浄後、FT シートとして使用した。FT シートは 3 回目の凍結サイクルの後、使用するまで凍結保存した (-80°C)。

Dry シートの乾燥速度、重量、含水率の測定

Living シートから Dry シートへ乾燥する過程における細胞シートの重量変化は、プラスチックプレート上に 8 枚の Living シートをピペット法で移動させ、バイオクリーンベンチ内に設置した Balance XS104 (Mettler Toledo 社) を用いて 1 分毎に測定した。測定は 3 回施行し、細胞シートの重量変化に基づいて乾燥速度を算出した。バイオクリーンベンチ内の環境条件 (温度、湿度、風速) は、HYGROPALM-HP32 (Rotronic 社) と INFURIDER Handy Anemometer (AP-816B, AOPUTTRIVER) を用いて測定した。

Japan Testing Laboratories 株式会社にて Dry シートの含水量測定を委託した。Dry シート 50 枚の総重量を測定後、メタノール 2 mL に 2 時間浸漬させ、メタノール中の水分量をカールフィッシャー法で測定した。カールフィッシャー法は 2 回施行した。

未固定細胞シートの 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色

未固定細胞シートを DAPI (同仁化学社) で染色した。画像は BZ-X710 顕微

鏡（キーエンス社）で撮影した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出

24-well plate から未剥離の積層線維芽細胞シート、Living シート、そして 5、10、15、30、45、60 分間の乾燥によって得られた Dry シートを 500 μ L PBS に室温 (23°C) で 30 分間浸漬した。各細胞シートの上清中の LDH を、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同人化学社) を使用して測定した。陰性コントロールには PBS を用い、また陽性コントロールには積層線維芽細胞シートを、キットに付属している Lysis Buffer を PBS で希釈し、終濃度 20% になるように調整した溶液 500 μ L に浸漬し、その上清を用いた。

再培養試験と再培養後の細胞シートの代謝活性

乾燥によって細胞の増殖能が喪失することを、再培養試験によって検討した。Living シートと 30 分間風乾した Dry シートを 2 ml の 10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地を含む別の 12-well プレートに移し、大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 24 時間培養した後、位相差光学顕微鏡で観察した。

さらに、再培養から 24 時間後の Living シートと Dry シートから培養上清を除去後、1 mL の溶液 (10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地に WST-8 試薬 (Cell Count Reagent SF、ナカライテスク社) を終濃度 10% となるように添加した培養液) を添加した。3 時間インキュベーションした後、上清の吸光度 (450 nm) を測定することにより代謝活性を調べた。

組織学的解析と免疫染色

各細胞シートを CellShifter (セルシード社) にのせた状態で組織標本を作製した。採取したマウス皮膚組織または各細胞シートは 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。3 μ m の厚さの切片をスライドに添付し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) またはアザン (Azan) によって染色した。免疫染色には以下の抗体を使用した。一次抗体として抗コラーゲン I 型抗体 (1:200, ab34710, Abcam, Cambridge, UK)、抗 FGF-2 抗体 (1:30, ab208687, Abcam)、抗 HMGB1 抗体 (1: 400, ab79823, Abcam)、また抗 CD31 抗体 (1:200, ab28364, Abcam) を使用した。二次抗体として DyLight®550 (1:200, ab96884; Abcam) を使用した。細胞核の染色には

DAPI を使用した。すべての組織画像は BZ-X710 顕微鏡で撮影し、BZ-X analyzer (キーエンス社) を用いて解析した。すべての組織学的所見は病理医の確認を得た。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

細胞シートは、蓋を閉じた 1.5 mL マイクロチューブ内で培養液に浸漬させた。細胞シート内の成長因子含有量を測定するために、各細胞シートを Cell Lysis Buffer 2 (R&D Systems 社) 200 μ L に室温で 30 分間浸漬させた。細胞シートから放出される成長因子を測定するために、細胞シートを 10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地 200 μ L に大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 24 時間浸漬させ、2,460 \times g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。ELISA 法による測定まで、溶出液サンプルは -30°C で保存し、VEGF、HGF、FGF-2 および HMGB1 の濃度は、Quantikine Immunoassay Kits (R&D Systems 社) および HMGB1 ELISA Kit Exp (SHINO-TEST 社) で測定した。

細胞シートの溶出液による線維芽細胞の細胞増殖能及び VEGF、HGF 産生量の解析

細胞シート溶出液は、各細胞シートを FBS 無添加 DMEM 200 μ L (Thermo Fisher Scientific 社) に大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 24 時間浸漬させ、遠心分離 (2,460 \times g、4°C、5 分) 後の上清を回収した。10% FBS 含有 DMEM で調製した線維芽細胞懸濁液 (8 \times 10⁴ cells/mL) を各 well に 100 μ L ずつ 96-well プレートに分注した後に、Living シート、Dry シート及び FT シートの各溶出液またはコントロールとして DMEM を 100 μ L 添加した。また 10% FBS 含有 DMEM を用いて 2 倍希釈した各細胞シートの溶出液を、線維芽細胞を含まない細胞シートの溶出液として、96-well プレートに分注した。大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 48 時間インキュベーション後、VEGF と HGF 濃度測定用に培養上清の一部を回収後、細胞増殖試験を行った。10% Cell Count Reagent SF を含む 5% FBS 含有 DMEM 100 μ L を各 well に加え、大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 1 時間インキュベーション後、上清の吸光度 (450 nm) を測定した。DMEM で培養した線維芽細胞をコントロールとして、細胞増殖率を算出した。培養上清中の VEGF と

HGF 濃度を ELISA 法で測定し、以下の計算式で VEGF と HGF の産生比を算出した：[(細胞シートの溶出液を加えて培養した線維芽細胞の上清中濃度) - (線維芽細胞を含まない細胞シートの溶出液の上清中濃度)] / (DMEM で培養した線維芽細胞の上清中濃度)。

中和抗体実験

Dry シートの溶出液は、前述の細胞増殖試験と同じ手順で調製した。また、recombinant FGF-2 protein (rFGF-2) 5 ng/mL (富士フィルム和光) を DMEM で調整した。準備したそれぞれのサンプルに抗 FGF-2 中和抗体 (30.3 µg/mL, #05-117, clone bFM-1, Merck Millipore)、またはコントロール抗体 (Mouse IgG1 isotype control, clone 11711; 30.3 µg/mL, MBA002, R&D Systems 社) を加え、37°C で 60 分間インキュベーションした。線維芽細胞を 1% FBS 含有 DMEM で調製した線維芽細胞懸濁液 (8×10^4 cells/mL) を各 well に 100 µL ずつ 96-well プレートに分注した後、各抗体を添加した Dry シート溶出液サンプル、または各抗体を添加した rFGF-2 (5 ng/mL) 含有 DMEM 100 µL、各抗体を添加した DMEM を加えた。大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 48 時間培養した後、培養上清を吸引除去し、10% Cell Count Reagent SF を含む 0.5% FBS 含有 DMEM 100 µL を各 well に加え、大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 2 時間インキュベーション後、上清の吸光度 (450 nm) を測定した。細胞増殖率は、コントロール抗体を用い、かつ rFGF-2 添加なしの DMEM で培養した線維芽細胞を対照として、それぞれの細胞増殖率を算出した。

糖尿病マウス全層皮膚欠損モデル及び細胞シート移植

雄の C57BL/6N マウス (6 週齢) にストレプトゾトシン (STZ; 富士フィルム和光) を 55 mg/kg、24 時間ごとに 5 日間連日腹腔内投与した。STZ 投与後 9 日目および 10 日目の血糖値が 300 mg/dL 以上であるマウスを糖尿病マウスと定義した。STZ 最終投与から 14 日目に、C57BL/6N マウスに 2% イソフルランによる吸入麻酔を施行し、生検パンチを用いて背側正中に 6mm の全層皮膚欠損創を作製した。Living シートと FT シートはピペッティング法で皮膚欠損部に貼付し、Dry シートはピンセットで把持し貼付した。各細胞シートは、雄の C57BL/6N マウス (自家細胞) および雄の C3H/He マウス (他家細胞)

から作製した。細胞シート移植後 24 時間は、創部を ADAPTIC (#2012; Acelity) と Derma Aid (#11893; ALCARE) で被覆し、シルキーテックスで固定した。1 日目以降は創部を Airwall Fuwari (# MA-E050-FT; 株式会社共和) で被覆し、シルキーテックスで固定した[9]。創傷は 0、1、3、5、7、9、11、13 日目に、直径 10.5mm の定規をあて、デジタルカメラで撮影した。創傷面積は ImageJ ソフトウェア (アメリカ国立衛生研究所) を用いて各創傷縁をマーキングし、創傷面積を測定した。創傷治癒率は、以下の計算式より算出した。[day X] (%) = {1 - (創傷部 [day X / 創傷部 [day 0])} × 100。Dry シートは室温 (23°C) で保存し、作製後 1 週間以内に本実験に使用した。

統計処理

記載のない限り平均値±標準偏差で示した。統計的比較は、一元配置分散分析に続いて、多重比較のための Tukey-Kramer 検定、または対照群に対する複数群の比較のための Dunnett 検定を使用した。2 群間の比較には Student's t-test を使用した。データの統計解析は Statcel (Microsoft Excel アドインソフトウェア、株式会社 OMS) を用いて行った。統計的有意性は $P < 0.05$ とした。

5. 結果

乾燥保存された積層線維芽細胞シートの作製

雄のマウス尻尾由来皮膚を採取し、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、10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地で培養した。CTS™ AIM-V 培地と HFDM-1 (+)培地に 5% FBS を加えた培地 2 mL を用いて、24-well プレートに初代線維芽細胞 (4.2×10^5 cells/well) を播種した。大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 2 日間培養、続いて低酸素条件下 (33°C, 5% CO₂, 2% O₂) で 1 日間培養 (低酸素プレコンディショニング) し、細胞シートを作製した[5-7]。培養後、ディスパーゼ処理した積層線維芽細胞シートを培養プレートから静かに剥離し、本研究において Living シートとして使用した。Living シート、Dry シートおよび FT シートの作製の流れを図 1a に示す。Living シートを 30 分間風乾したものが Dry シート、Living シートに凍結解凍操作を繰り返したものが FT シートである。各細胞シートの

肉眼像を図 1b に示す。Living シートは、培養プレートから剥離すると、およそ半分の大きさにまで収縮した。Dry シートは平面形状を維持しており、かつピンセットなどで扱っても細胞シートの形状を維持できる強度を有し、ハンドリングも容易であった（補足図 S1）。FT シートは、Living シートよりも透過性を認めた。

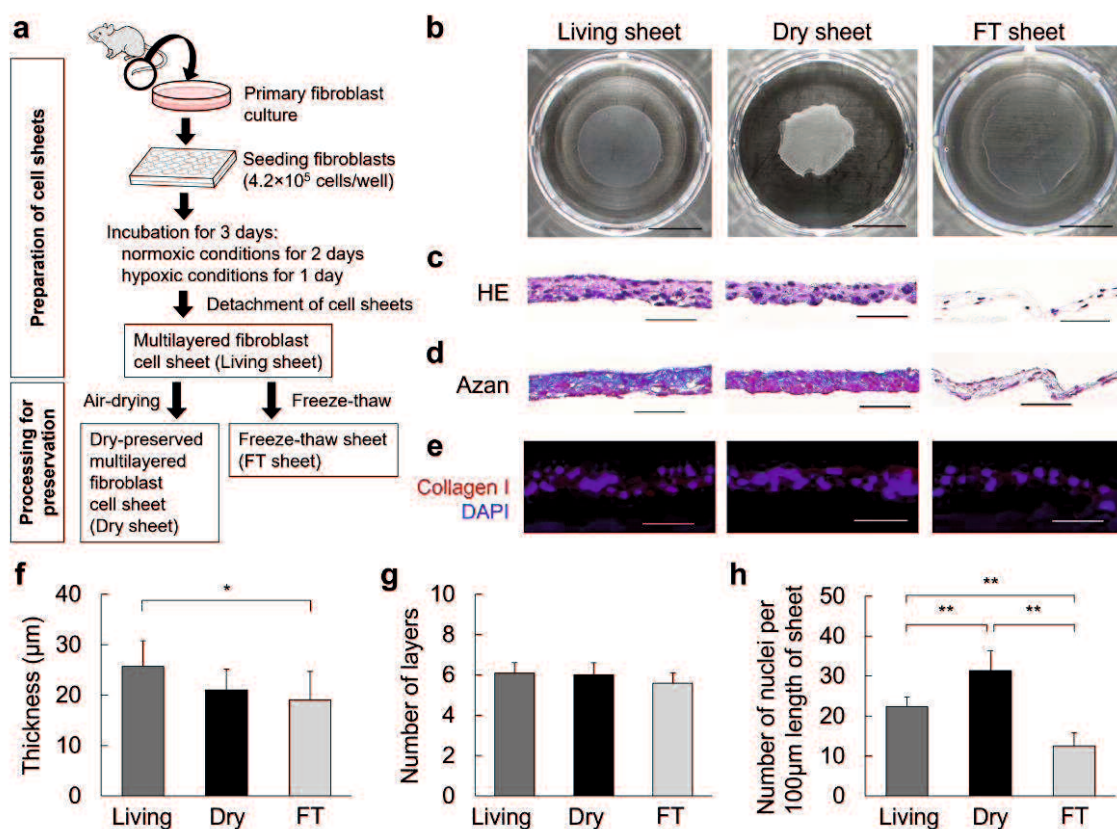


図 1. 細胞シートの作製と組織学的解析

(a) Living シート、Dry シート、FT シートの作製の概要図。(b) Living シート、Dry シート、FT シートの肉眼像。各細胞シートは 24-well プレートに配置（スケールバー=5 mm）。(c) HE 染色による Living シート、Dry シート、FT シートの切片像（スケールバー=50 μm ）。(d) Azan 染色による Living シート、Dry シート、FT シートの切片像（スケールバー=50 μm ）。(e) コラーゲンタイプ I（赤）と DAPI（青）の免疫蛍光染色による Living シート、Dry シート、FT シートの切片像（スケールバー=50 μm ）。(f)

各細胞シートの厚さの平均値。平均値±標準偏差 (* : P < 0.05, Tukey-Kramer test, 各グループ n = 6)。(g) 各細胞シートの平均層数。平均値±標準偏差 (Tukey-Kramer 検定、各グループ n = 6)。(h) 各細胞シートにおける核の平均数。各細胞シートの切片において、100 μm 内の核の総数を測定した。平均±標準偏差 (** : P < 0.01, Tukey-Kramer test, 各グループ n = 6)。

細胞シートの組織学的所見

Living シート、Dry シートおよび FT シートの各細胞シートの切片標本を HE 染色又は Azan 染色し、顕微鏡で観察した結果を図 1c と図 1d に示す。すべての細胞シートは多細胞の積層構造であった。各細胞シートの厚さ (μm)、積層数、及び各細胞シート 100 μm 長あたりの核の数を図 1f-h に示す。Dry シートは Living シートより少し薄くなり、厚さは $21 \pm 4.2 \mu\text{m}$ 、5~7 層構造であった (図 1f, g)。Dry シートでは、細胞核が膨張し、大きさにばらつきがあるなど、わずかながら形態的な変化が見られた。FT シートでは変化が大きく、核とクロマチンの数が大幅に減少していた。100 μm の細胞シート断面あたりの核の数は、乾燥後は体積が小さくなるためか、Dry シートで有意に多かった (図 1h)。アザン染色においてコラーゲンを示す青色の領域と、蛍光免疫染色で細胞外マトリックス I 型コラーゲンを示す赤色の領域に関しては、すべての細胞シートに認められ、Living シート、Dry シート、FT シートの順で多かった。

乾燥積層線維芽細胞シートの特徴

Living シートをバイオクリーンベンチ内で、平均温度 30.7°C ($27.6 \sim 31.4^{\circ}\text{C}$)、平均湿度 39.6% ($31.1 \sim 49.6\%$)、風速 $0.1 \sim 0.4 \text{ m/s}$ の条件下で風乾により乾燥させた。風乾時の Living シートから Dry シートへの重量変化を測定した。Living シートの平均重量は 6.9 mg/シート であり、乾燥時間とともに、重量は減少し、平均 13.7 分 (9 分、12 分、20 分の 3 回の測定の平均) で重量の平衡状態に達していた。Dry シートの重量は 0.31 mg/シート (図 2a)、面積は $0.31 \text{ cm}^2/\text{シート}$ 、カールフィッシャー法で測定した平衡含水率は 3.2% であり、乾燥速度は 7.9

mg/min/cm²であった。

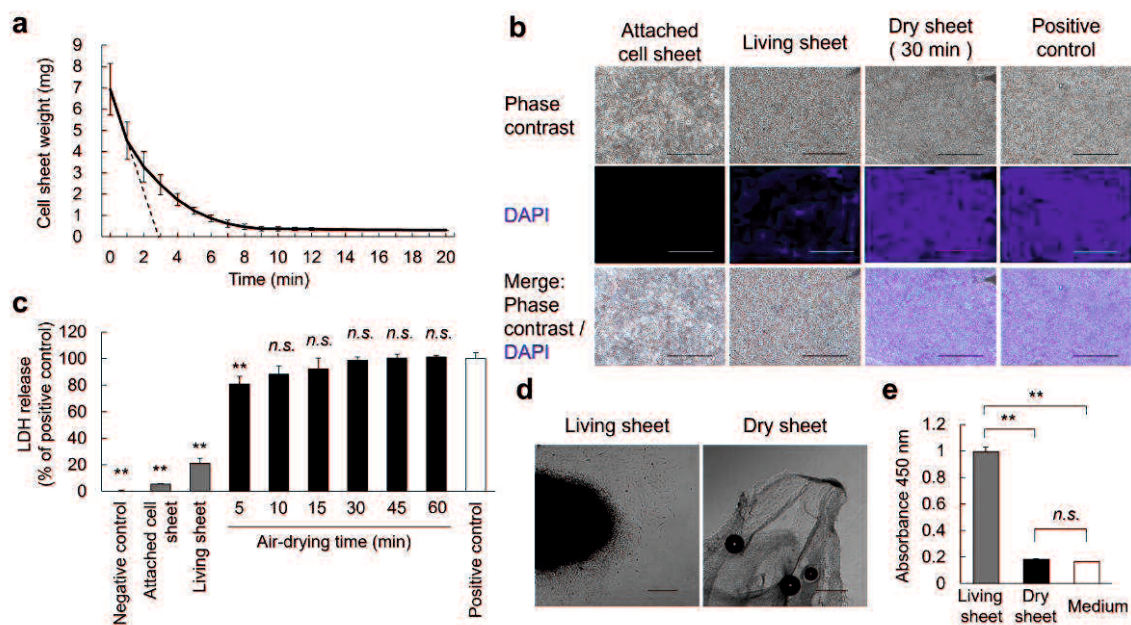


図 2. 乾燥時間による細胞シートの重量変化と細胞死に関する検討

(a) 乾燥時間による細胞シートの重量の変化。Living シートの平均重量は 6.9 mg。平均 13.7 分の乾燥後の平均重量は 0.31 mg。実線は変化重量、点線は初期乾燥速度を示す。(b) 未固定の Living シートと Dry シートの DAPI 染色。メタノールに浸した Living シートを陽性コントロール、未剥離の積層線維芽細胞シートを陰性コントロールとした (スケールバー=50 μm)。(c) LDH 放出アッセイによる細胞シートの乾燥時間と細胞膜障害の検討。Lysis Buffer に浸漬した Living シートを陽性コントロール、PBS を陰性コントロールとした。平均値±標準偏差 (**: P < 0.01, n.s.: 陽性コントロールに対して有意差なし、Tukey-Kramer test、各グループ n = 6)。(d) 再培養試験による細胞シートの増殖能の検討。Living シート (左) は培養皿に接着し、Living シートの縁からの線維芽細胞の増殖像が観察されたが、Dry シート (右) には観察されなかった (スケールバー=50 μm)。(e) 24 時間再培養した細胞シートの細胞代謝活性を WST-8 試薬で評価した。平均±標準偏差 (**: P < 0.01, n.s.: 有意差なし、Tukey-Kramer test、各グループ n = 4)。Medium : 10% FBS 含有

CTS™ AIM-V。

積層線維芽細胞シートは乾燥により細胞膜が障害され生命活動を停止する

乾燥による細胞死を評価するために、未固定の細胞シートを DAPI で染色し、細胞膜の損傷を検出した。Living シートでは、一部の核のみが DAPI で染色された (図 2b)。乾燥時間 5 分、10 分、15 分では、細胞シートの辺縁から順に核が DAPI で染色されていたが、細胞シートの中心部には未染色の部分が認められた (補足図 S2)。乾燥時間 30 分の Dry シートでは、ほとんどすべての核が DAPI で染色されていた。このことから、細胞膜の障害は乾燥時間に影響を受けていることが示唆された。

乾燥時間と損傷した細胞の割合との関係性を検討するために、細胞膜の損傷を定量的に評価できる乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出アッセイを行った。陽性コントロール (細胞溶解液で処理した積層線維芽細胞シート) に含まれる LDH の量を 100% とすると、Living シートでは LDH の放出率は 21% であった。Dry シートにおいては、LDH の放出率は乾燥時間の経過とともに増加し、10 分で 88%、15 分で 92%、30 分後に 98% 以上となり、平衡乾燥重量の推移と一致していた (図 2c)。

細胞の生存を確認するために、細胞シートを 24 時間再培養した。Living シートと 30 分間風乾した Dry シートを 2 mL の 10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地を含む 12 well プレートに移し、大気酸素条件で 24 時間培養した。Living シートは培養皿の底面に接着し、細胞シートの辺縁から線維芽細胞の遊出を認めた。一方、Dry シートでは、培養皿への接着や線維芽細胞の遊出を認めなかった (図 2d)。24 時間培養した Dry シートは、代謝活性を示さず、吸光度は培養液と同程度であった (図 2e)。これらの結果から、Dry シートの細胞膜は乾燥によって損傷し、不可逆的に生命活動が停止していることを示唆された。

以上の結果に基づき、本研究での乾燥時間は、確実な乾燥状態が得られる 30 分に設定した。以下の実験では、30 分間風乾させ、常温で保存期間が 1 週間以内の Dry シートを使用して実行した。

Dry シート内の成長因子及びサイトカインは細胞外に放出される

Dry シートに保持されている生理活性物質を評価するために、細胞溶解液で溶解した細胞シートの上清中の VEGF、HGF、FGF-2、及び HMGB1 を ELISA 法で測定した。Dry シートの溶解液では Living シートの溶解液とほぼ同程度の各成長因子又はサイトカインが検出されたが、FT シートでは有意に低い値で成長因子又はサイトカインをほとんど保持していなかった (図 3a)。次に、これらの成長因子が Dry シートから培養溶液中に放出されるかどうかを検討した。Living シート、Dry シート及び FT シートの各細胞シートを 200 μ L の 10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地に 24 時間浸漬した後、遠心分離 (4°C、5,000 rpm、5 分) した上清を溶出液として回収した。VEGF と HGF は Living シートと Dry シートの両方の溶出液で検出されたが、FGF-2 と HMGB1 は Dry シートの溶出液でのみ検出された (図 3b)。さらに、免疫蛍光染色により、各細胞シートにおける FGF-2 及び HMGB1 の局在を観察したところ、FGF-2 は、Living シートと Dry シートの細胞質に局在していたが、FT シートではほとんど認められなかった (図 3c)。HMGB1 は、Living シートと Dry シートの細胞核に局在していたが、FT シートではほとんど認められなかった (図 3d)。加えて、FGF-2 と HMGB1 は、Dry シートを再水和させた後には著明に減少した (補足図 S3)。これらの結果は、Dry シートの細胞内の FGF-2 及び核内の HMGB1 は、乾燥によって細胞膜及び核膜が損傷し、溶出液に浸漬することで細胞外に容易に放出されることが明らかとなった。

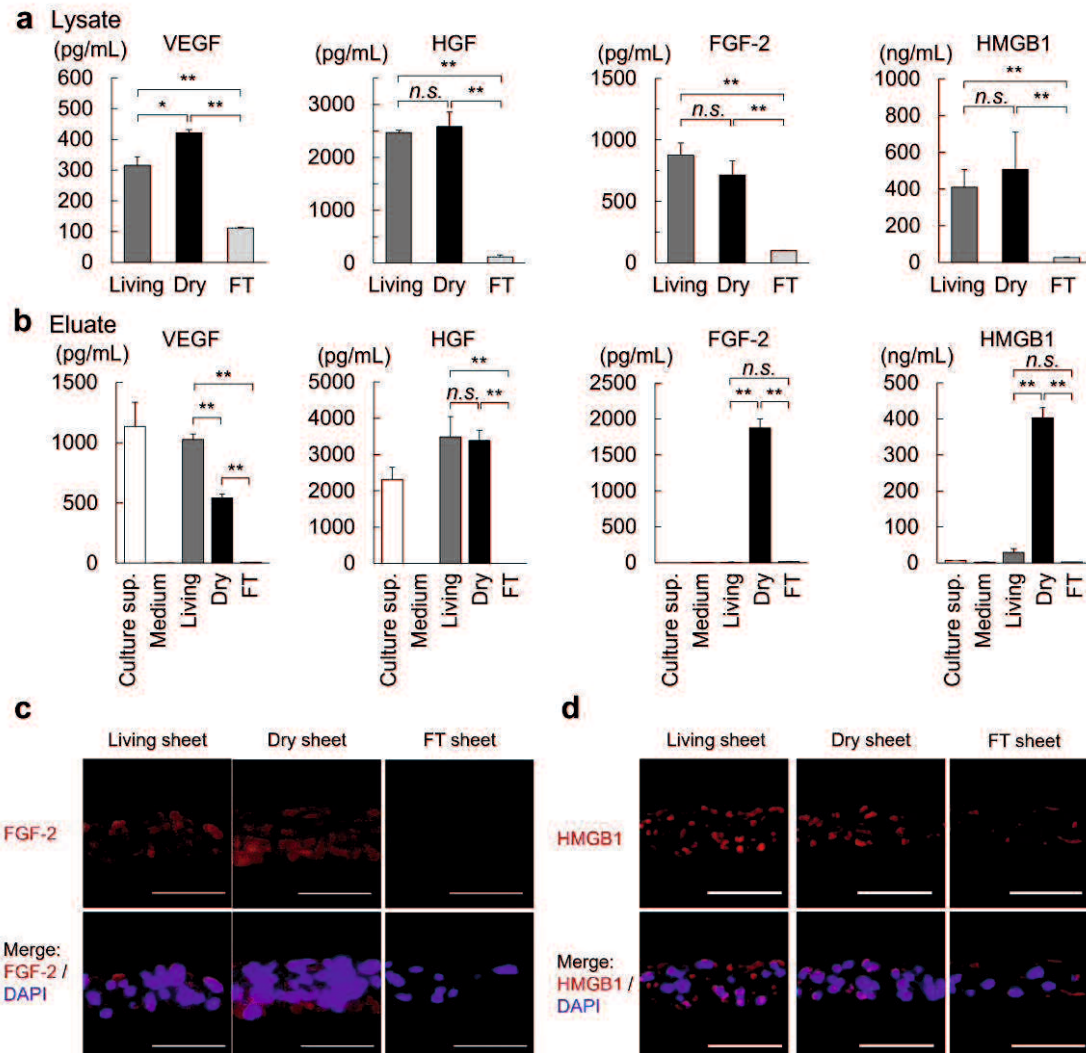


図 3. Dry シートに保持される成長因子及びサイトカインの細胞外への放出

(a) 各細胞シートの成長因子及びサイトカインの保持量。各細胞シート溶解液の上清中の VEGF、HGF、FGF-2、HMGB1 濃度を ELISA 法により測定した。各細胞シート溶解液は、細胞シートを 200 μ L の Cell lysis buffer 2 に浸漬し作製した。平均値 \pm 標準偏差 (** : $P < 0.01$ 、n.s. : 有意差なし、Tukey-Kramer 検定、各グループ $n = 3$)。 (b) 各細胞シートからの成長因子及びサイトカインの放出量。各細胞シートの溶出液サンプルの上清中の VEGF、HGF、FGF-2、HMGB1 濃度を ELISA 法で測定した。溶出液サンプルは、10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 200 μ L に各細胞シートを 24 時間、大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で浸漬することにより調製した。平均値 \pm 標準偏差 (** : $P < 0.01$, Tukey-Kramer test, 各グループ $n = 4$)。有意差は、

Living シート、Dry シート、FT シート間のみで検討した。Culture sup.: 積層線維芽細胞シート作製時の培養上清 (5% FBS 含有 CTS™ AIM-V + HFDM-1(+))、Medium: 10% FBS 含有 CTS™ AIM-V。 (c) Living シート、Dry シート、および FT シートの組織切片の FGF-2 (赤) および DAPI (青) の免疫蛍光染色像 (スケールバー=50 μ m)。 (d) Living シート、Dry シート、および FT シートの組織切片の HMGB1 (赤) および DAPI (青) の免疫蛍光染色像 (スケールバー=50 μ m)。 Living: Living シート; Dry: Dry シート; FT: FT シート。

Dry シートの溶出液は線維芽細胞の細胞増殖及び VEGF、HGF 産生を促進する

Dry シートの溶出液の生物活性を検討するために、線維芽細胞の細胞増殖及び線維芽細胞からの VEGF、HGF 産生の促進効果を調べた。培地と溶出液を 1:1 の割合で混合して線維芽細胞を 48 時間培養した。線維芽細胞の細胞増殖アッセイでは、Dry シートの溶出液は、コントロールに比べて細胞増殖率が 1.75 倍高く、Living シートまたは FT シートの溶出液に比べ有意な細胞増殖能を示した (図 4a)。次に、48 時間後の培養上清中の VEGF と HGF の濃度を測定した (図 4b, c)。線維芽細胞に Dry シート溶出液を加え 48 時間培養した上清中の VEGF 及び HGF 濃度は、コントロールと比較して有意な上昇を認めたが、線維芽細胞を含まない Dry シート溶出液のみを 48 時間インキュベーションした場合は、図 3b でみられたような VEGF 及び HGF の検出は認められなかった。これは、48 時間のインキュベーション中の成長因子の安定性に原因があったと考えられる。従って、線維芽細胞の有無間の値の差は、Dry シートの溶出液の刺激により線維芽細胞から新たに産生された VEGF 及び HGF の量とみなし、コントロールに対する比率として比較した (図 4d, e)。Dry シートの溶出液は、コントロールに比べ 1.53 倍有意に高い VEGF の産生を誘導し、コントロールに比べ 4.64 倍有意に高い HGF の産生を誘導した。これらの結果は、Dry シートの溶出液が細胞に生物学的影響を与えたことを示すものである。

FGF-2 中和抗体は Dry シート溶出液による線維芽細胞の細胞増殖を阻害する

FGF-2 は強力な増殖因子である。Dry シートの溶出液には FGF-2 が多量に含

まれていたため、FGF-2 は生物活性に影響を及ぼす可能性がある。そこで、FGF-2 に対する中和抗体または rFGF-2 を用いて、溶出液中の FGF-2 が線維芽細胞の増殖に影響するか否かを調べた。

コントロール抗体 (Mouse IgG1 isotype control) の存在下において、Dry シートの溶出液または rFGF-2 による線維芽細胞の増殖反応は促進された。しかし、これらの増殖反応は、FGF-2 中和抗体により有意に抑制された (図 4f)。これらの結果は、Dry シートの溶出液の生理活性が主に FGF-2 の効果によるものであることを示唆する。

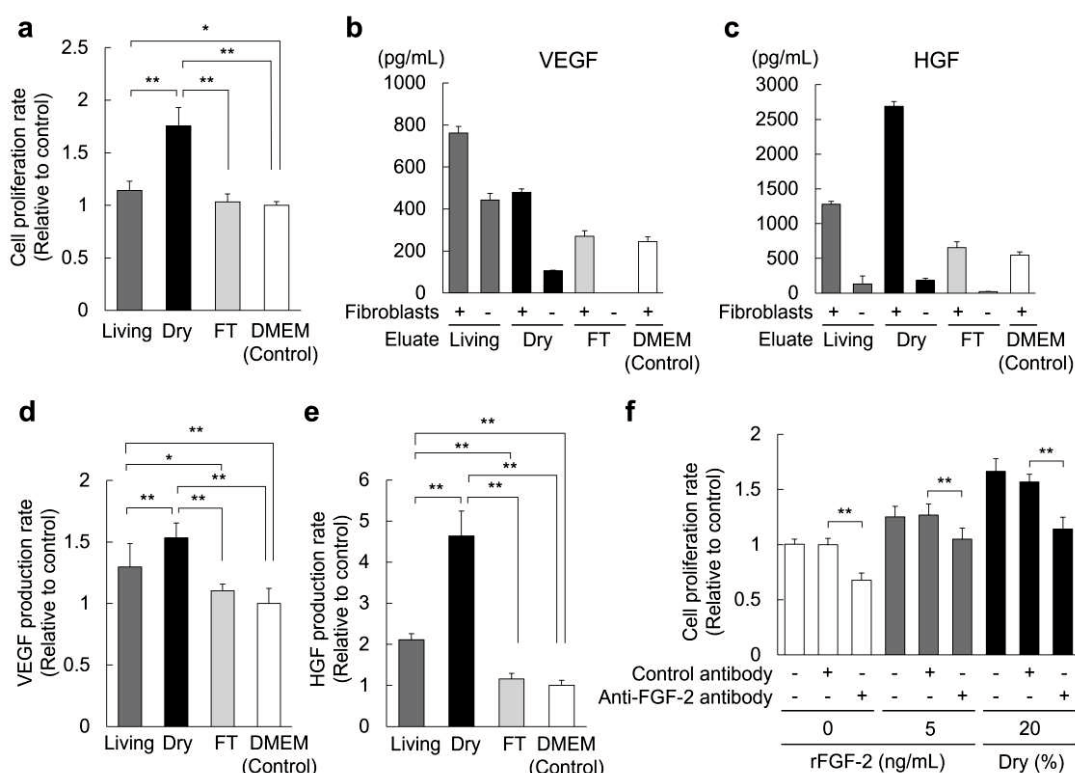


図 4. Dry シートの溶出液による線維芽細胞の細胞増殖及び VEGF、HGF 産生の促進

各細胞シートの溶出液サンプルは、各細胞シートを FBS 無添加 DMEM 200 μ L (Thermo Fisher Scientific 社) に大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 24 時間浸漬させて採取した。上清は遠心分離 (2,460 \times g, 4°C, 5 分) を施行後に採取した。(a) 線維芽細胞を、10% FBS 含有 DMEM 100 μ L 中で細胞濃度 8,000 cells/well で 96-well プレートに播種し、続いて、Living シート、Dry シート及び FT シートの各細胞シートから調製した溶出液サンプルま

たはコントロールとして DMEM を 100 μ L 添加した。また線維芽細胞を播種せずに 10% FBS 含有 DMEM を用いて 2 倍希釈した各細胞シートの溶出液サンプルを作製した。大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 48 時間インキュベーション後、培養上清を回収して VEGF と HGF 濃度を測定した。また上清回収後、細胞代謝活性の測定を行った。10% Cell Count Reagent SF を含む 5% FBS 含有 DMEM 100 μ L を各 well に加え、大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 1 時間インキュベーションし、続いて上清の吸光度 (450nm) を測定した。DMEM で培養した線維芽細胞をコントロールとして、細胞増殖率を算出した。(b, c) 各細胞シートの溶出液で刺激した線維芽細胞の培養上清中の VEGF 及び HGF 濃度。(d, e) 各細胞シートの溶出液で刺激した線維芽細胞からの VEGF 及び HGF の産生比。以下の計算式で VEGF 及び HGF の産生比を算出した：[(溶出液サンプルを加えて培養した線維芽細胞の上清中濃度) - (線維芽細胞を含まない溶出液サンプルの上清中濃度)] / (DMEM で培養した線維芽細胞の上清中濃度)。(f) Dry シートの溶出液は、前述の細胞代謝活性の解析と同じ手順で採取した。また、recombinant FGF-2 protein (rFGF-2) 5 ng/mL (富士フイルム和光) を DMEM で調整した。準備したそれぞれのサンプルに抗 FGF-2 中和抗体 (30.3 μ g/mL, #05-117, clone bFM-1, Merck Millipore)、またはコントロール抗体 (Mouse IgG1 isotype control, clone11711; 30.3 μ g/mL, MBA002, R&D Systems 社) を加え、37°C で 60 分間インキュベーションした。線維芽細胞を 1% FBS 含有 DMEM 100 μ L に細胞濃度 8,000 cells/well で 96-well プレートに播種し、その後、各抗体を添加し濃度を調整した Dry シート溶出液サンプル、または各抗体を添加した rFGF-2 (5ng/mL) 含有 DMEM 100 μ L、各抗体を添加した DMEM を加えた。大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 48 時間培養した後、培養上清を吸引し、10% Cell Count Reagent SF を含む 0.5% FBS 含有 DMEM 100 μ L を各 well に加え、大気酸素条件下 (37°C, 5% CO₂, 20% O₂) で 2 時間インキュベーション後、上清の吸光度 (450nm) を測定した。細胞増殖率は、コントロール抗体を用い、かつ rFGF-2 添加なしの DMEM で培養した線維芽細胞を対照として、それぞれの細胞増殖率を算出した。すべての数値は平均土標準偏差で示す(* : P < 0.05, ** : P < 0.01, Tukey-Kramer test, 各グループ n = 9)。

糖尿病マウスの全層皮膚欠損モデルにおける創傷治癒効果

糖尿病マウス (C57BL/6N) の 6mm 全層皮膚欠損部に自家 (C57BL/6N) および他家 (C3H/He) 細胞シートを移植し、0、1、3、5、7、9、11 および 13 日目に各創傷を評価した (n = 6 ; 図 5a、b)。創の閉鎖率は、無治療群 (control) よりも自家及び他家 Dry シート治療群で有意に高かった。具体的には、5 日目[自家 Dry シート群、他家 Dry シート群 vs. 無治療群 = 74.2 ± 5.0% (P < 0.05)、80.0 ± 4.9% (P < 0.01) vs. 51.0 ± 7.2%]、7 日目[自家 Dry シート群、他家 Dry シート群 vs. 無治療群 = 95.8 ± 2.1% (P < 0.01)、90.0 ± 4.0% (P < 0.05) vs. 72.4 ± 5.7%]、9 日目[自家 Dry シート群 vs. 無治療群 = 99.4 ± 0.5% (P < 0.01) : 91.0 ± 2.4%]であった (図 5c、d)。したがって、Dry シートは難治性皮膚潰瘍の治療効果があることや、5 日目、7 日目という早い段階から治癒効果があることが明らかとなった。細胞シート貼付後 30 日目の創部組織像に関して、自家移植、他家移植ともにすべての細胞シート移植群において、無治療群と比較し創傷治癒後の皮膚組織に異常所見は認められなかった (補足図 S4)。

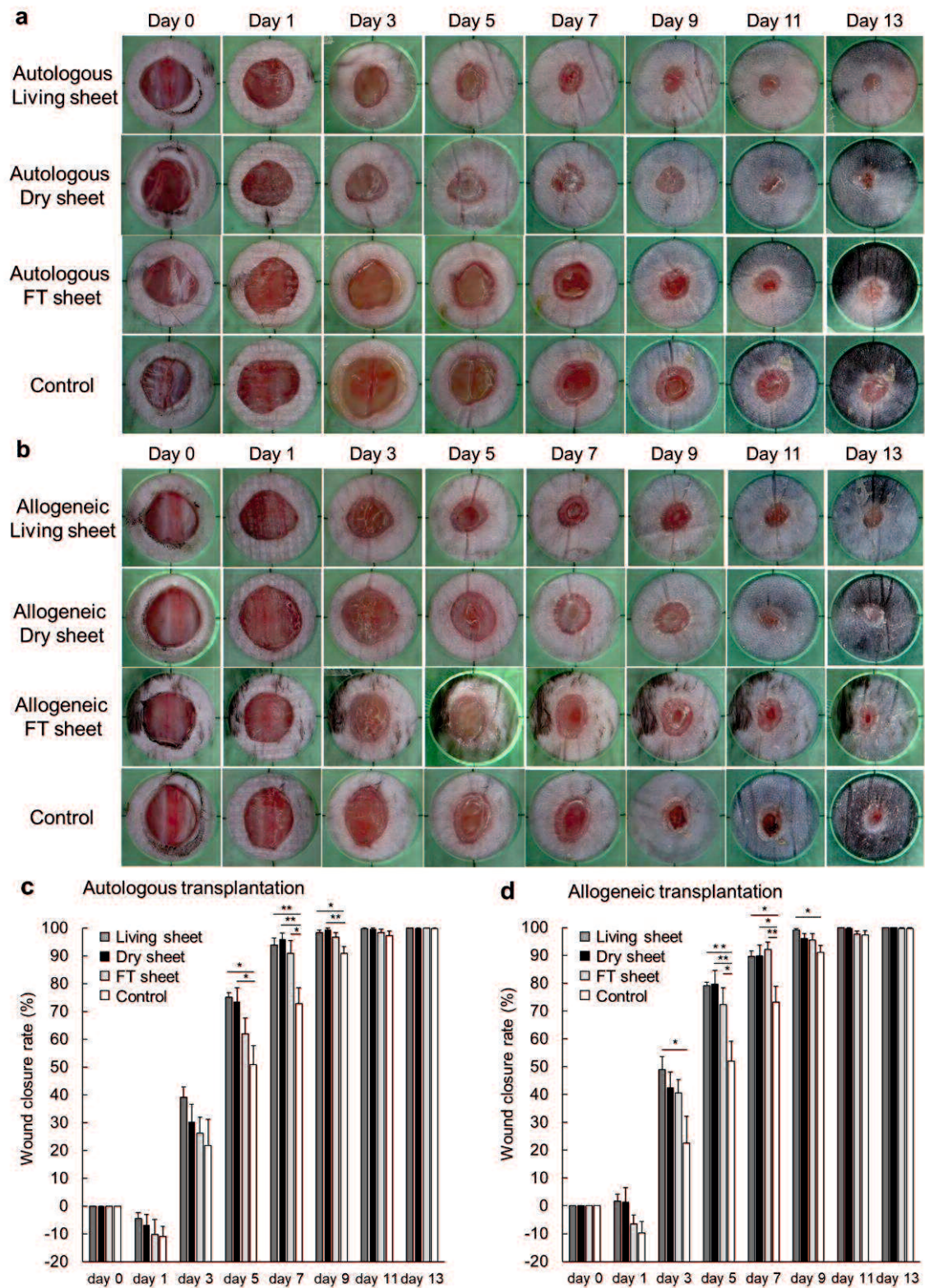


図 5. 糖尿病マウスの全層皮膚欠損モデルにおける創傷治癒効果

(a) 自家の各細胞シート移植における 0、1、3、5、7、9、11、13 日目の創傷

部の肉眼所見。糖尿病マウス全層皮膚欠損モデル (C57BL/6N) に、自家線維芽細胞 (C57BL/6N) で作製した Living シート、Dry シート、FT シートを移植した。Control は無治療を示す。(b) 他家の各細胞シート移植における 0、1、3、5、7、9、11、13 日目の創傷部の肉眼所見。糖尿病マウス全層皮膚欠損モデル (C57BL/6N) に、他家線維芽細胞 (C3H/He) で作製した Living シート、Dry シート、FT シートを移植した。Control は無治療を示す。(c) Living シート (n = 6)、Dry シート (n = 6)、FT シート (n = 6) および無治療群 (control) (n = 6) による自家細胞シート移植の創傷閉鎖率。創傷閉鎖率は、初期の創傷面積に対する縮小比として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。平均値±標準誤差 (* : P < 0.05, ** : P < 0.01, Tukey-Kramer test)。(d) Living シート (n = 6)、Dry シート (n = 6)、FT シート (n = 6) およびコントロール (無治療) 群 (n = 6) による他家細胞シート移植の創傷閉鎖率。創傷閉鎖率は、初期の創傷面積に対する縮小比として算出された。エラーバーは標準誤差を示す。平均値±標準誤差 (* : P < 0.05, ** : P < 0.01, Tukey-Kramer test)。

創傷治癒過程における他家 Dry シートの局在

糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルの創傷治癒過程における他家 Dry シートの局在について検討した。Dry シートは、Azan 染色により細胞シートのコラーゲン繊維が青く染色され (図 6b、d)、貼付部位での識別も可能であった (図 1d)。移植 1 日目において、Dry シートは創部全体を覆っていた (図 6a、c)。Dry シートには、好中球やマクロファージと思われる白血球の浸潤が認められた。浸潤した白血球の核と Dry シート由来の細胞の核とでは、明らかな色調の違いを認めた。浸潤した白血球の核は HE 染色でははっきりと確認できたが、Dry シート由来の細胞の核は、移植後の時間経過とともに淡く不鮮明に染色された (補足図 S5)。Dry シート移植後 3 日、5 日、7 日目の Azan 染色では、移植 1 日目と比較してシート状の構造が "折れ曲がり"、崩壊しているようにみられた。Dry シートは表皮組織から脱落することなく、移植後 3 日目以降は、

形成された痂皮または表皮組織の直下に存在していた。さらに、Dry シートは移植後 9 日目の切片では認められなかった。一方、無治療群 (control) では、シート状構造は観察されなかった (図 6e、f)。興味深いことに、組織学的評価からも、Dry シート治療群での創傷治癒の促進を示唆する所見が確認できた。移植後 3 日目において、他家 Dry シート治療群では、無治療群 (control) に比べ、創縁の角化細胞層と微小血管の数が有意に増加していた (補足図 S6a-d)。また、創傷治癒過程の肉眼的評価 (図 5b、d) と同様に、移植後 5 日目と 7 日目の新生上皮長は、他家 Dry シート治療群では無治療群 (control) に比べ有意な伸長を示した (補足図 S6e-h)。

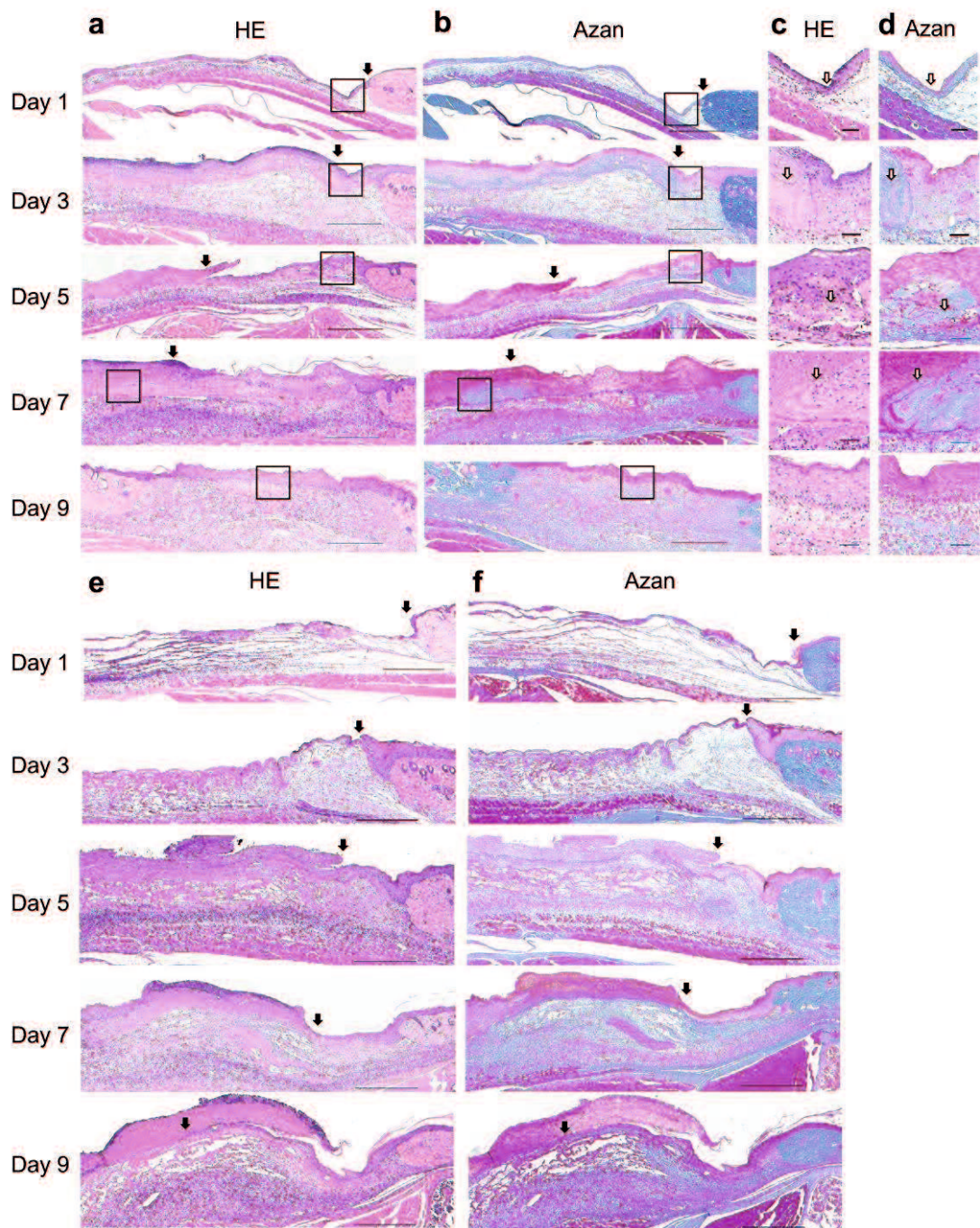


図 6. Dry シート移植後治療経過における組織学的解析

(a) Dry シート移植後 1、3、5、7、9 日目のマウスの創傷皮膚の HE 染色断面図 (スケールバー=500 μm)。黒矢印は新生上皮の縁を示す。(b) Dry シート移植後 1、3、5、7、9 日目のマウスの創傷皮膚の Azan 染色断面図 (スケールバー=500 μm)。黒矢印は新生上皮の縁を示す。(c) 図 6a の四角で囲った部分の拡大図 (スケールバー=50 μm)。白矢印は Dry シートを示す。(d) 図 6b の

四角で囲った部分の拡大図（スケールバー＝50 μm ）。白矢印は Dry シートを示す。(e) 無治療群の 1、3、5、7、9 日目の創傷皮膚の HE 染色断面図（スケールバー＝500 μm ）。黒矢印は新生上皮の縁を示す。(f) 無治療群の 1、3、5、7、9 日目の創傷皮膚の Azan 染色断面図（スケールバー＝500 μm ）。黒矢印は新生上皮の縁を示す。

Dry シートに保持される成長因子又はサイトカインの保存安定性

同日に作製した Dry シートを使用して、温度及び保存期間による Dry シートに保持される成長因子又はサイトカインの安定性を検討した。Dry シートを冷蔵（4 $^{\circ}\text{C}$ ）または室温（23 $^{\circ}\text{C}$ ）で 1 日、1、2、4 週間保存した後、10% FBS 含有 CTSTTM AIM-V 培地に 24 時間浸漬させ、その溶出液を測定日まで -30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。VEGF と HGF の濃度は温度や保存期間による大きな変動は見られなかったが、FGF-2 と HMGB1 の濃度は室温（23 $^{\circ}\text{C}$ ）において 4 週間の保存期間中に徐々に低下した（図 7）。これらの結果から、Dry シートは冷蔵保存が適しており、少なくとも 4 週間は安定した状態を保つことが実証された。

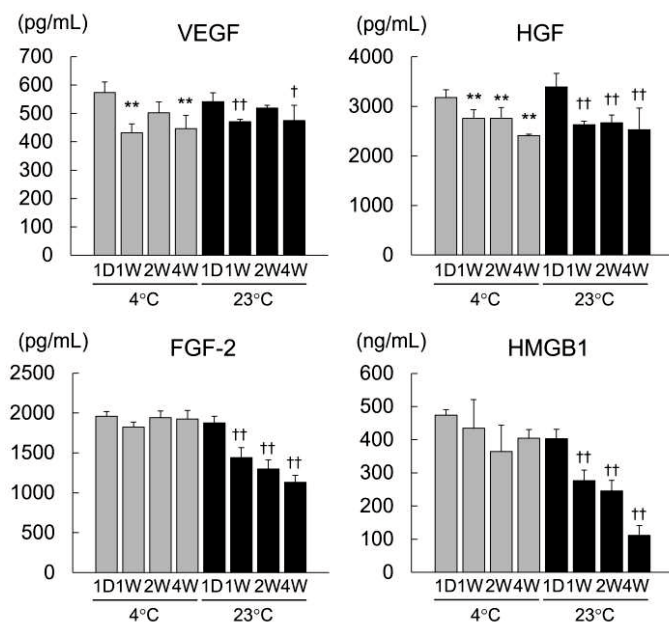


図 7. Dry シートに保持される成長因子又はサイトカインの保存安定性

同日に作製した Dry シートを冷蔵（4 $^{\circ}\text{C}$ ）または室温（23 $^{\circ}\text{C}$ ）で 1 日、1、2、

4週間保存した後、10% FBS 含有 CTS™ AIM-V 培地に 24 時間浸漬させ、その溶出液を測定日まで -30°C で保存した。Dry シートの溶出液の上清中の VEGF、HGF、FGF-2、HMGB1 の濃度を ELISA 法で測定した。

1D：保存期間 1 日。1W：保存期間 1 週間。2W：2 週間の保存期間。4W：4 週間の保存期間。平均値±標準偏差 (*: $P < 0.05$ 、1D 4°C に対する検討、**: $P < 0.01$ 、1D 4°C に対する検討、†: $P < 0.05$ 、1D 23°C に対する検討、††: $P < 0.01$ 、1D 23°C に対する検討。Dunnett test、各グループ $n = 4$)。

6. 考察

細胞シート移植治療において、最も重要な作用を持つのは生きた細胞であり、その細胞が作り出す成長因子やサイトカインによって治療効果が得られるとされている。この理論に基づき、これまでの我々の研究では、細胞シートが VEGF、HGF、transforming growth factor-beta 1、monocyte chemotactic protein 1 などの様々な成長因子やサイトカインを産生し、創傷治癒を促進することを明らかにしてきた[7,9]。そのため、生きた細胞のない Dry シートは、持続的な成長因子の分泌はなく、創傷治癒の促進には限定的な効果しかないと一般的に考えられている。驚くべきことに、自家細胞や他家細胞を用いた Dry シートは、Living シートと比較して、糖尿病マウスの創傷治癒において有意に効果が低くなることはなく、無治療群 (control) と比較し有意に創傷治癒を促進させた (図 5)。これは、Dry シートと FT シートの違いに注目すると、Dry シートから放出される生理活性物質によって誘導されたと考えられる。

VEGF、HGF、FGF-2、HMGB1 などの成長因子やサイトカインは、Dry シートの細胞に Living シートの細胞と同程度に保持されており、これらの物質は Dry シートの細胞から溶液中に容易に放出された (図 3a、b)。注目すべきことに、細胞質内の FGF-2 と核内の HMGB1 は、Living シートからは分泌されず、Dry シートからのみ放出されたことである (図 3b)。線維芽細胞増殖能を評価する *in vitro* での実験において、Dry シートの溶出液は Living シートの溶出液よりも強い生理活性を示した (図 4a)。さらに、Dry シートの溶出液は線維芽細胞を刺激し、VEGF や HGF の産生を促進したことから (図 4b-d)、Dry シートから放出される生理活性物質が直接的及び間接的に創傷治癒や血管新生の促進に関与することが示唆された。

Dry シートから培地中に放出された高濃度の FGF-2 は、生理活性を有して

いた。FGF-2は強力な成長因子であり、創傷治癒や血管新生を促進するために重要である[16]。FGF-2は線維芽細胞に多く発現しているが、分泌シグナルペプチドがないため、一般に細胞外への分泌は行われておらず、主にFGF-2は損傷した細胞や死んだ細胞から放出される[17-20]。間葉系幹細胞

(mesenchymal stromal cell : MSC) 移植療法に関する先行研究では、損傷したMSCから放出される高レベルのFGF-2が血管新生と神経形成を促進することが示された[20]。しかし、これまでに細胞シートから分泌されるエフェクターとしてFGF-2に関する報告はない。本研究では、Dryシートの溶出液は線維芽細胞の増殖活性を促進し、FGF-2中和抗体で処理した溶出液では有意に増殖を抑制することを明らかにした(図4f)。これらの結果は、Dryシートから放出されたFGF-2が創傷治癒や血管新生の促進において重要な役割を果たすことを示唆している。

糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルを用いたin vivoの実験では、13日目にDryシート群と無治療群(control)との間で創の閉鎖率に差は認められなかった。しかし、移植後5日目、7日目、9日目の肉眼的観察による創の閉鎖率には有意な差を認めた(図5)。移植後5日目および7日目の創傷部の組織学的評価において、Dryシート群では上皮化が有意に促進され(補足図S6e-h)、移植後3日目の創縁の微小血管数および表皮角化細胞の増殖にも有意差が認められた(補足図S6a-d)。このことは、移植後早期の段階でDryシートから生理活性物質が放出され、線維芽細胞、表皮角化細胞そして血管内皮細胞などの創傷部周囲の細胞を直接的及び間接的に刺激し、創傷治癒を促進した可能性を示唆する。Dryシートの移植後早期において、ECMを含むシート状の構造体が創傷部を覆うことによって外的要因から創傷部を保護していると推察されるが(図6)、今回の研究においてシート状の構造体内部での細胞増殖の確認はできなかった。本研究において使用した細胞シートの特徴や考えられる作用機序について図8に示した。

Dryシートの溶出液に過剰量のFGF-2中和抗体を加えると、コントロールと同程度に細胞増殖は抑制された。しかし、Dryシートの溶出液による細胞増殖の亢進は、rFGF-2単独の反応よりも高値であった(図4f)。この結果は、FGF-2以外の物質も細胞増殖に影響を与える可能性を示唆している。さらなる研究が必要であるが、防御因子としての働きを担い[21,22]、創傷治癒促進にも関与し[23-26]、alaminsと総称されるHMGB1もDryシートから放出され、

ゆえに複数の要因が相乗的に作用して創傷治癒を促進させると考えられる。

我々の以前の研究、ルシフェラーゼ発現線維芽細胞を用いた *in vivo* イメージング解析では、自家及び他家細胞にかかわらず、マウス皮膚潰瘍モデルへの移植後 9 日目までにルシフェラーゼ発現細胞の消失を確認している[9]。同様に、創傷治癒の過程を組織学的に観察したところ、他家 Dry シートは表皮下に局在していたが、移植後 9 日目の上皮化完了後の組織標本において Dry シートは残存していなかった (図 6)。Dry シートは浸潤した白血球によって自然に分解され、吸収されたと考えられる。ヒトの他家移植を想定し、マウス潰瘍モデルにヒト由来表皮細胞シートを用いた研究において、創傷治癒の過程で細胞シートは生体外に排泄されることが確認されている[27]。これらのことから、線維芽細胞由来の Dry シートは、分解・吸収されることから、体表面だけでなく、生体内の臓器にも使用できると考えられる。これまでの研究で、術後の気管支漏や腭液漏に対して、積層線維芽細胞シートが有効であることを動物モデルで明らかにした[28,29]。以上のことから、Dry シートは組織の修復促進効果を持ち、術後の様々な合併症を予防する生体被覆材としての利用も期待される。

今回、冷蔵保存された Dry シートに保持される生理活性物質は、少なくとも 1 ヶ月間は安定であること、また一部の生理活性物質においては室温保存でも保持されていることを確認した (図 7)。糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルにおいて、室温保存された作製から 7 日以内の Dry シートを使用し、Dry シート治療群は無治療群 (control) に比べ、有意な創傷治癒促進を認めた。In vitro の保存安定性試験において、FGF-2 は保存温度に影響されることが明らかになったため、保存温度を厳密に管理することでより良い治療効果が期待できると考えられる。

Dry シートは、ある程度の強度を保ったままシート状の構造を維持しているため、細胞シート移植治療に必要な支持体なしで使用でき、取り扱いが容易であるという利点がある (補足図 S1)。すでに臨床において、乾燥羊膜シートが皮膚潰瘍の治療に使用されている[30]。線維芽細胞由来の Dry シートは、材料の安定供給やドナーによる感染症に関する安全性においてメリットがある。Dry シートは大量生産が可能であり、安定した供給と均一な品質の確保が可能となる。

本研究の限界として、これまでの我々の研究[5-7]を踏襲し、低酸素プレコン

ディショニングは線維芽細胞の成長因子の分泌能を亢進させることから、本研究で使用した細胞シートはすべて低酸素プレコンディショニングを行った積層線維芽細胞シートから作製したことである。当初は、Dry シートは Living シートと同じ成長因子を放出することで創傷治癒効果を持つと仮説を立てていたが、Living シートの作用機序とは異なり、Living シートからは分泌されない FGF-2 の Dry シートからの放出が創傷治癒に重要な役割を果たすことが示唆された。したがって、低酸素プレコンディショニングが Dry シートに保持される成長因子に及ぼす影響については、今後の検討が必要である。



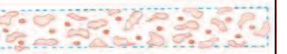
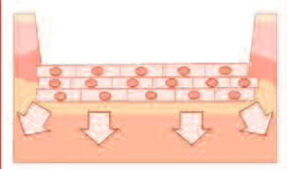
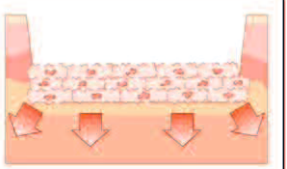
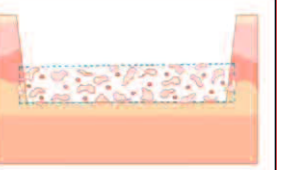
| Cell sheet type | Living sheet | Dry sheet | FT sheet |
|----------------------|---|--|---|
| Schema |  |  |  |
| Cell membrane | Normal ○ | Damaged × | Damaged × |
| ECM | Holding ○ | Holding ○ | Holding ○ |
| Bioactive substances | Retention ○ | Retention ○ | Almost no retention × |
| Mechanism |  <ul style="list-style-type: none"> • Paracrine signaling, continuously (VEGF, HGF etc.) • ECM |  <ul style="list-style-type: none"> • Release of bioactive substances, transiently (VEGF, HGF, FGF-2, HMGB1) • ECM |  <ul style="list-style-type: none"> • ECM |

図 8. 各細胞シートの創傷治癒効果のメカニズムの模式図

Living シートは、創傷部に貼付後に生着することで最大の治療効果を発揮すると考えられる。Living シートが生着している間は、大量の成長因子を分泌し続け、パラクライン効果によって創傷治癒が促進される。Dry シートを創傷部に貼付すると、様々な成長因子が一過性に放出され、血管新生や創傷部周囲の細胞の活性化を促すと考えられる。また、すべての細胞シートは ECM を保持しており、創傷部を外的因子より保護することで創傷治癒を促進した可能性がある。以上の作用機序の違いから、創傷治癒促進作用は、Living シート、Dry シート、FT シートの順で促進される。

ECM : extracellular matrix (細胞外マトリックス)。

7. 結語

本研究は、糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルに対する他家 Dry シートの創傷治癒促進効果が自家 Dry シートと遜色のないことを示した研究である。重要な点は、Dry シートは FGF-2 などの生理活性物質を保持し、また容易に放出することで創傷治癒促進効果を示したことである。Dry シートは冷蔵や室温での保存が可能であるため、迅速かつ安定供給することが可能となる。他家細胞を用いた Dry シートは創傷治癒を促す再生医療において新たな扱いやすい被覆材である。

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柳原正志先生（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] Matsuura, K., Utoh, R., Nagase, K. & Okano, T. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J Control Release* 190, 228–239 (2014). 10.1016/j.jconrel.2014.05.024, Pubmed:24858800.
- [2] Chang, D. et al. Application of mesenchymal stem cell sheet to treatment of ischemic heart disease. *Stem Cell Res. Ther.* 12, 384 (2021). 10.1186/s13287-021-02451-1, Pubmed:34233729.
- [3] Kanzaki, M., Sekine, H., Takagi, R. & Yamato, M. Bioartificial pleura using allogenic cell sheet for closing of lung air leakage. *JTCVS Tech.* 4, 336–340 (2020). 10.1016/j.xjtc.2020.09.024, Pubmed:34318067.
- [4] Ohki, T. et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 55, 1704–1710 (2006). 10.1136/gut.2005.088518, Pubmed:16709659.
- [5] Ueno, K. et al. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci. Rep.* 6, 28538 (2016). 10.1038/srep28538, Pubmed:27329845.
- [6] Takeuchi, Y. et al. 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). Pubmed:28559984.
- [7] Mizoguchi, T. et al. Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 47, 201–211 (2018). 10.1159/000489767, Pubmed:29763904.
- [8] Mizoguchi, T. et al. 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.* 13, 9495–9504 (2021). Pubmed:34540071.
- [9] Nagase, T. et al. Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice. *Am. J. Transl. Res.* 12, 2652–2663 (2020). Pubmed:32655797.

- [10] Xing, Q. et al. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 77–87 (2015). 10.1089/ten.tec.2013.0666, Pubmed:24866751.
- [11] Hodde, J. et al. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 537–543 (2007). 10.1007/s10856-007-2300-x, Pubmed:17546412.
- [12] Navrátilová, Z., Slonková, V., Semrádová, V., & Adler, J. Cryopreserved and lyophilized cultured epidermal allografts in the treatment of leg ulcers: a pilot study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18, 173–179 (2004). 10.1111/j.1468-3083.2004.00873.x, Pubmed: 15009297.
- [13] Jang, H., Kim, Y. H., Kim, M. K., Lee, K. H. & Jeon, S. Wound-healing potential of Cultured Epidermal Sheets is unaltered after lyophilization: A preclinical study in comparison to cryopreserved CES. *BioMed Res. Int.* 2013, 907209 (2013). 10.1155/2013/907209.
- [14] Tomita, T. et al. New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery. *J. Neurol. Surg. B Skull Base* 73, 302–307 (2012). 10.1055/s-0032-1321506, Pubmed:24083120.
- [15] Dhall, S. et al. Properties of viable lyopreserved amnion are equivalent to viable cryopreserved amnion with the convenience of ambient storage. *PLOS ONE* 13, e0204060 (2018). 10.1371/journal.pone.0204060, Pubmed:30278042.
- [16] Yu, P. J., Ferrari, G., Galloway, A. C., Mignatti, P., & Pintucci, G. Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age. *J Cell. Biochem.* 100, 1100–1108 (2007). 10.1002/jcb.21116, Pubmed:17131363.
- [17] Gajdusek, C. M., & Carbon, S., Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol.* 139, 570–579 (1989). 10.1002/jcp.1041390317, Pubmed:2738102.
- [18] McNeil, P. L., Muthukrishnan, L., Warder, E., & PA D'Amore, P. A. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol.* 109, 811–822 (1989). 10.1083/jcb.109.2.811,

Pubmed:2760113.

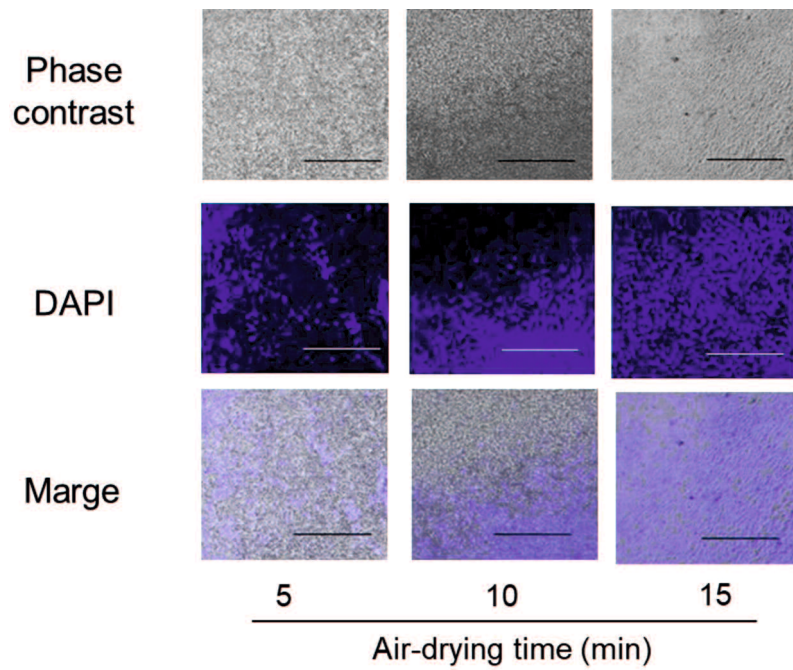
- [19] D'Amore, P. A. Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 227–238 (1990). 10.1007/BF00046362, Pubmed:2292137.
- [20] Aizman, I., Vinodkumar, D., McGrogan, M. & Bates, D. Cell injury-induced release of fibroblast growth factor 2: Relevance to intracerebral mesenchymal stromal cell transplantations. *Stem Cells Dev.* 24, 1623–1634 (2015). 10.1089/scd.2015.0083, Pubmed:25873141.
- [21] Harris, H. E. & Raucchi, A. Alarmin(g) news about danger: Workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep.* 7, 774–778 (2006). 10.1038/sj.embor.7400759, Pubmed:16858429.
- [22] Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191–195 (2002). 10.1038/nature00858, Pubmed:12110890.
- [23] Tamai, K. et al. PDGFR α -positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6609–6614 (2011). 10.1073/pnas.1016753108, Pubmed:21464317.
- [24] Inuma, S. et al. Transplanted bone marrow-derived circulating PDGFR α + cells restore type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse skin graft. *J. Immunol.* 194, 1996–2003 (2015). 10.4049/jimmunol.1400914, Pubmed:25601922.
- [25] Aikawa, E., Fujita, R., Kikuchi, Y., Kaneda, Y. & Tamai, K. Systemic high-mobility group box 1 administration suppresses skin inflammation by inducing an accumulation of PDGFR α (+) mesenchymal cells from bone marrow. *Sci. Rep.* 5, 11008 (2015). 10.1038/srep11008, Pubmed:26046579.
- [26] Wilgus, T. A. Alerting the body to tissue injury: The role of alarmins and DAMPs in cutaneous wound healing. *Curr. Pathobiol. Rep.* 6, 55–60 (2018). 10.1007/s40139-018-0162-1, Pubmed:29862143.
- [27] Sakamoto, M. et al. Human cultured epidermis accelerates wound healing regardless of its viability in a diabetic mouse model. *PLOS ONE* 15, e0237985 (2020). 10.1371/journal.pone.0237985, Pubmed:32822395.

- [28] Yoshimine, S. et al. Autologous multilayered fibroblast sheets can reinforce bronchial stump in a rat model. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (2021). 10.1053/j.semtcvs.2021.03.010, Pubmed:33711463.
- [29] Iwamoto, K. et al. Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis. *Am. J. Transl. Res.* 13, 1257–1268 (2021). Pubmed:33841654.
- [30] Laurent, I., Astère, M., Wang, K. R., Cheng, Q. F., & Li, Q. F. Efficacy and Time Sensitivity of Amniotic Membrane treatment in Patients with Diabetic Foot Ulcers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes ther.* 8, 967–979 (2017). 10.1007/s13300-017-0298-8, Pubmed:28895073.



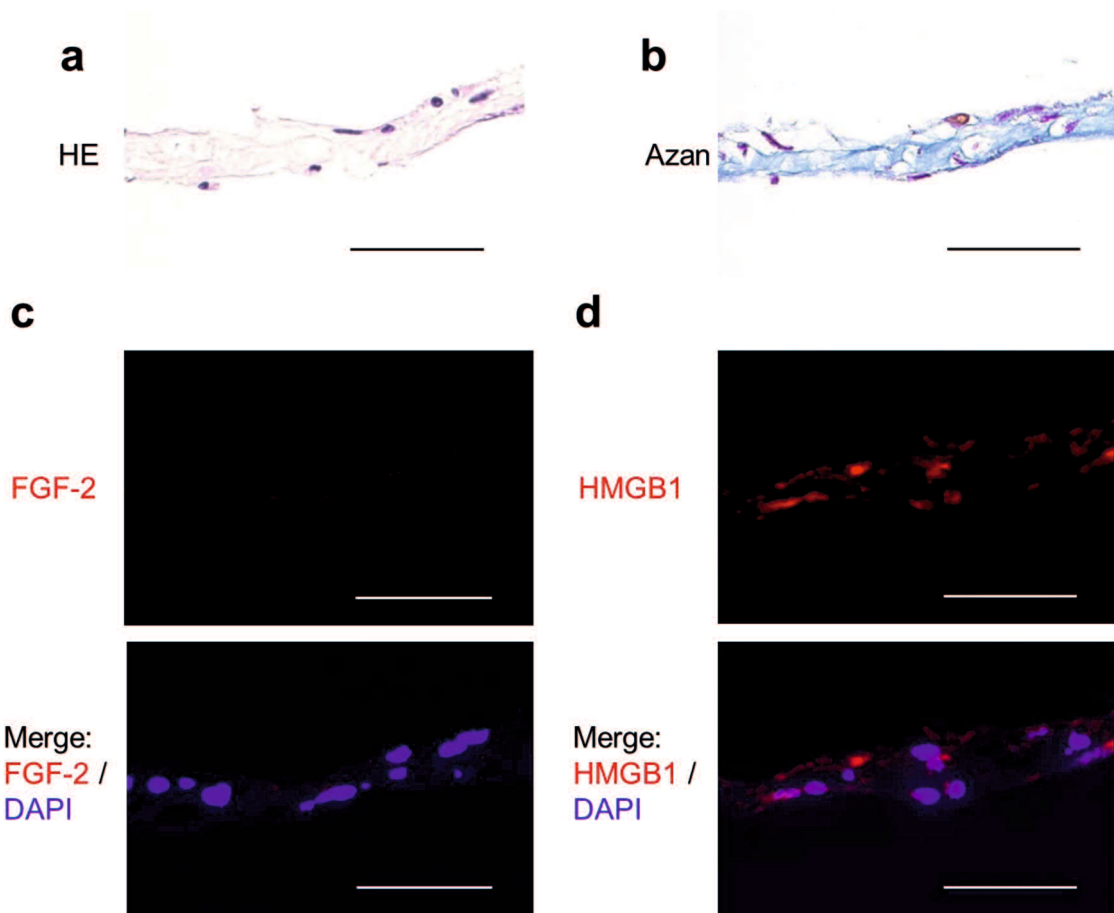
補足図 S1. 全層皮膚欠損マウスの創傷部へのドライシート移植の写真

Dry シートは、ピンセットで容易に把持して移植することが可能であった。



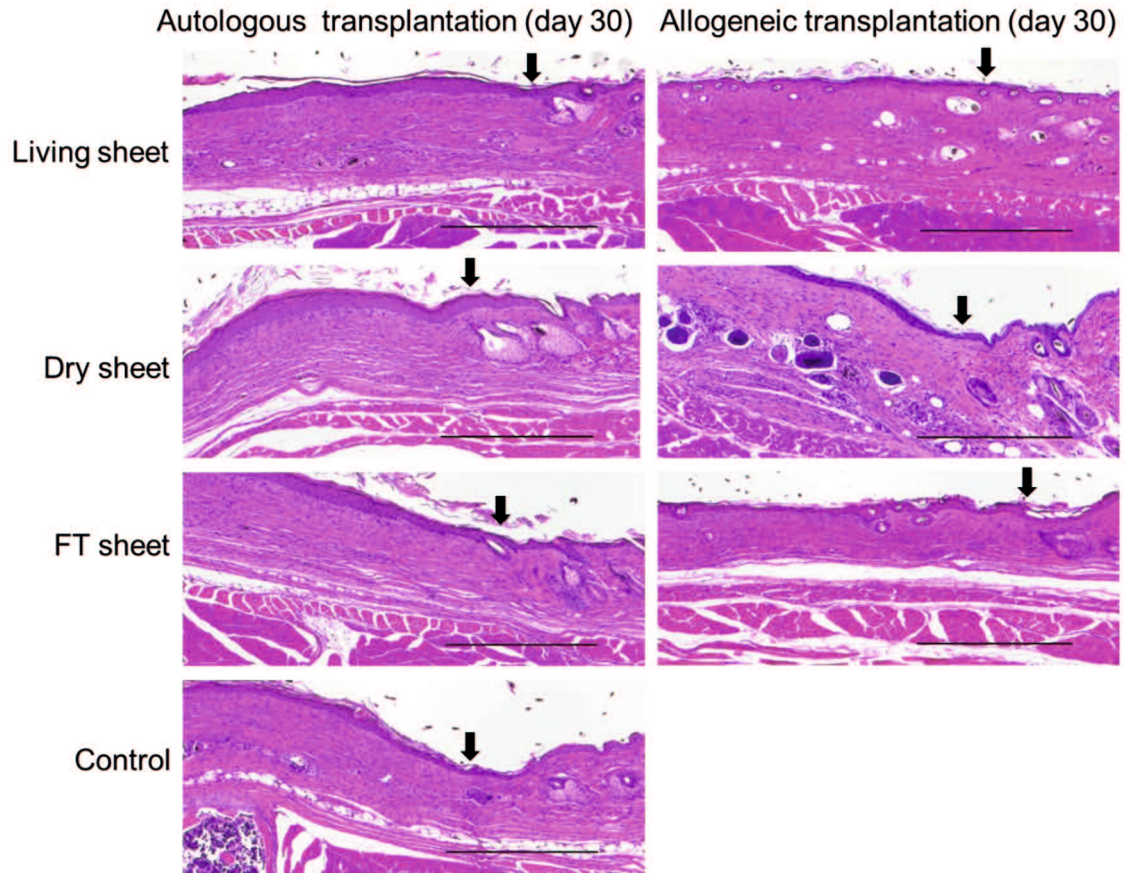
補足図 S2. 細胞シートの乾燥時間と DAPI 染色の変化

乾燥時間 5 分、10 分、15 分では、細胞シートの辺縁の核から DAPI により染色される所見を認められたが、細胞シートの中心部には染色されていない部分が残存していた。



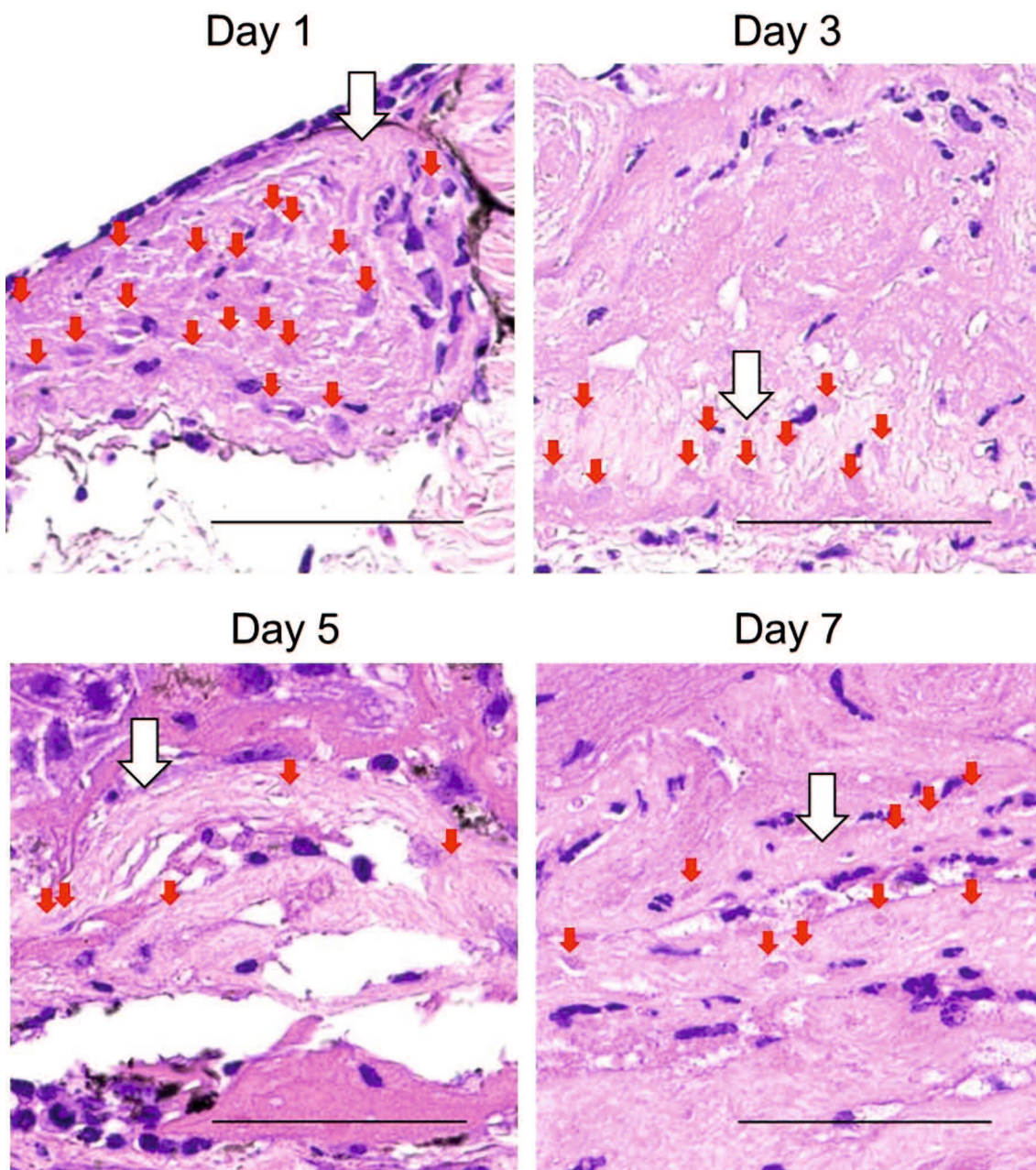
補足図 S3. 再水和後の Dry シートの組織学的解析

(a) HE 染色による再水和後の Dry シートの切片像 (スケールバー=50 μm)。
 (b) アザン染色による Dry シートの再水和後の切片断面像 (スケールバー=50 μm)。(c) 再水和後の Dry シートの組織切片の FGF-2 (赤) と DAPI (青) の免疫蛍光染色像 (スケールバー=50 μm)。(d) 再水和後の Dry シートの組織切片の HMGB1 (赤) と DAPI (青) の免疫蛍光染色像 (スケールバー=50 μm)。



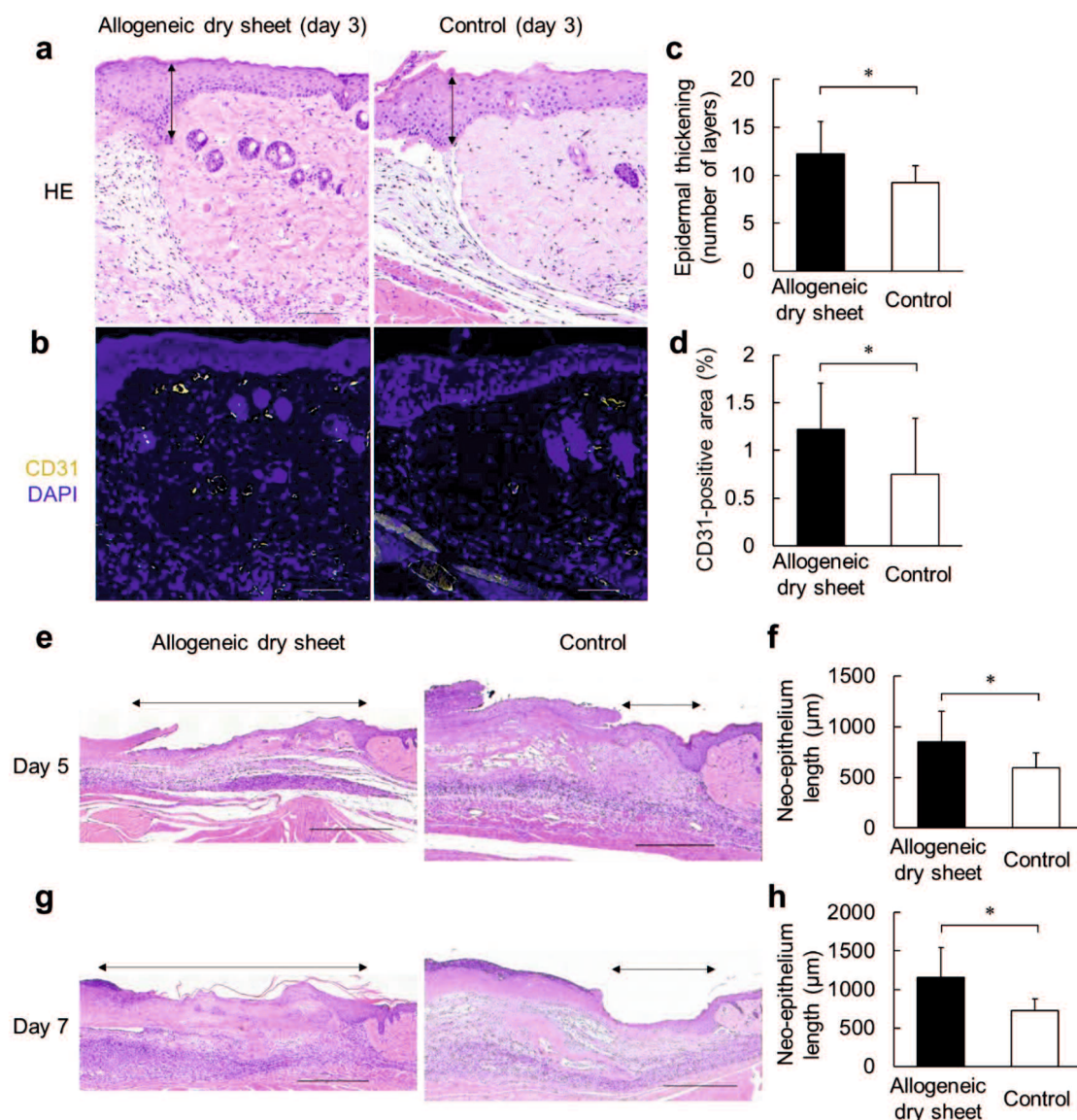
補足図 S4. 各細胞シートの移植 30 日後の組織学的解析

移植後 30 日目の HE 染色の代表的な断面像 (スケールバー=500 μm)。黒矢印は癒痕縁を示す。



補足図 S5. 他家 Dry シートの貪食像

他家 Dry シートを移植後 1、3、5、7 日目のマウスの皮膚創傷部の HE 染色断面像（スケールバー=50 μ m）。白矢印は Dry シートを示す。赤矢印は、Dry シート由来の細胞の核を示す。



補足図 S6. Dry シート移植後の創傷部の組織学的解析

(a) 移植後 3 日目の創縁を HE 染色した断面像 (スケールバー=50 μm)。黒矢印は創縁のケラチノサイト層の測定部位を示す。(b) 移植後 3 日目の創縁の CD31 (黄) および DAPI (青) の免疫蛍光染色像 ; (スケールバー=50 μm)。(c) 創縁のケラチノサイトの層の数 (各群 $n = 3$ 、観音開きで作製した組織標本 1 切片あたり 4 つの創縁を計測した)。値は平均 \pm 標準偏差で示す (* : $P < 0.05$ 、Student t-test)。(d) 創縁における CD31 陽性細胞が占める面積率を算出した (各群 $n = 3$ 、観音開きで作製した組織標本 1 切片あたり 4 つの創縁を計測した)。値は平均 \pm 標準偏差で示す (* : $P < 0.05$ 、Student t-test)。(e) 移植後 5 日目の創縁の HE 染色像 (スケールバー=500 μm)。

(f) 移植後 5 日目の新生上皮の長さ (各群 $n = 2$ 、観音開きで作製した組織標本 1 切片あたり 4 つの創縁を計測した)。値は平均±標準偏差で示す (* : $P < 0.05$ 、Student t-test)。 (g) 移植後 7 日目の創縁の HE 染色像 (スケールバー = 500 μm)。黒矢印は新生上皮を示す。 (h) 移植後 7 日目の新生表皮の長さ (各群 $n = 2$ 、観音開きで作製した組織標本 1 切片あたり 4 つの創縁を計測した)。値は平均±標準偏差で示す (* : $P < 0.05$ 、Student t-test)。