

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

再生療法での普及を目指した
乾燥保存型積層線維芽細胞シートの開発

松野祐太郎

JCHO徳山中央病院 心臓血管外科 周南市孝田町1番1号 (〒745-8522)

Key words : 再生医療, 細胞シート移植治療, 線維芽細胞シート, 乾燥保存, 創傷治癒

和文抄録

細胞シート移植治療の普及には, 同種 (他家) 細胞を用いてオフ・ザ・シェルフ (既製品) として量産化することで製造コストを抑えるとともに, 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。後者の保存方法に関して, 細胞の生存率は治療効果を左右するため, その保存には高い細胞生存率が期待できる凍結保存法が検討されてきた。しかし, 凍結・解凍時の細胞障害や凍結時に特殊な装置を必要とし, 保管や輸送など含めコストや設備面に課題が残る。我々は細胞シートの新たな保存法として乾燥保存に着目し, 風乾させた積層線維芽細胞シート (Dry sheet) を開発した。マウスでの基礎検討から, Dry sheetは細胞膜が損傷した死細胞であるが, 細胞内に貯蔵する成長因子の放出という新たな作用機序を有し, 他家細胞で作製したDry sheetは糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルの血管新生と創傷治癒を促進することが明らかになった。Dry sheetから放出される成長因子は生理活性を有し, 主にFibroblast growth factor-2 (FGF-2/basic FGF) の作用であることがFGF-2中和抗体を用いた阻害実験から示された。また, Dry sheetの成長因子は冷蔵保存で少なくとも1ヵ月の保存安定性を認めた。Dry sheetのヒトへの臨床応用を見据え, 各種ヒト細胞での細胞内FGF-2含有量を検討したところ, 間葉系幹細胞や歯髄幹細胞, 線維芽細胞の間葉系細胞

に多く含まれていた。これらの細胞で作製したDry sheetの各種成長因子の放出量や生物活性は, 線維芽細胞のDry sheetが最も優れた成績を示した。FGF-2含有量が高いことに加え, 細胞増殖が速く, 取り扱いが容易で入手しやすく, 培養コストが低いなどの点を考慮すると, ヒト線維芽細胞はDry sheetの理想的な細胞源であると考えられた。Dry sheetは操作性と保存性の点で従来の細胞シートよりも優れ, 難治性皮膚潰瘍の治療や外科手術時の組織の補強材としての応用が期待される。

1. はじめに

近年, 移植細胞の組織滞在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⁾。著者の所属する研究室では, 重症下肢虚血による難治性皮膚潰瘍にも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。細胞シート移植治療による創傷治癒促進の機序の一つは移植細胞が分泌する成長因子やサイトカインによるパラクライン効果であり, 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) を増

強することが特徴である^{5, 6)}。マウスとラビットの皮膚潰瘍モデルにおいて、自家細胞の細胞混合シート移植による治療は、難治性皮膚潰瘍の既存薬であるフィブラストスプレー（科研製薬）よりも優れた治療成績であった^{5, 6)}。また独自の技術により細胞を積層させた細胞シートの作製法を考案し、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⁾。これらの基礎研究を踏まえ、令和2年に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）」が実施され、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が認められた⁸⁾。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、テーラーメイド治療であるため、細胞シート作製には自己組織採取の侵襲性、細胞培養に要する時間による治療までのタイムラグと高額な費用、患者毎に線維芽細胞の増殖能に差が存在するという問題点がある。同臨床試験において、患者自身の細胞の機能低下（VEGF産生能の低下、細胞増殖能の低下）が6例中3例と高率に認められ、細胞シートを作製できず治療機会を逸するという新たな課題が浮き彫りになった。我々は、独自に開発した積層化技術によってPBMNCsを含まない積層線維芽細胞シートでも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ている^{7, 9)}。他家積層線維芽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、高品質かつ安定供給可能な同種（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、レディメイドな細胞シート移植治療の実用化には、利便性に優れる細胞シートの保存法の開発が急務である。

細胞シートの保存法に関して、創傷治癒は細胞シートが分泌する成長因子により促進されると考えられていたため、生細胞を保存する凍結保存が主に検討されてきた。細胞の凍結保存法は細胞バンク事業

などのライフサイエンス分野で培われてきた凍結保存技術をベースに細胞シートへの応用が試みられている。我々は生鮮食品の鮮度を保つ急速凍結技術（3D freezer）を細胞シートの凍結保存への応用を試み、解凍後の細胞シートの高い細胞生存率を報告している¹⁰⁾。しかし、凍結・解凍時の細胞障害によるある程度の細胞ロスは免れないこと、特殊な急速冷凍装置を必要とし、保管や輸送などに超低温冷凍庫（-80℃）が必要であるなどコストや設備面にも課題が残る。一方、食品分野では凍結保存法とともに乾燥保存法が広く普及しているが、細胞シートの乾燥保存に関する研究は培養表皮細胞シートのみであり¹¹⁾、線維芽細胞シートでは行われておらず、有用性に関する知見も無い。著者らは、細胞シートの簡便な利用が可能となる乾燥保存法に着目し、バイオクリーンベンチ内で風乾させた積層線維芽細胞シートを開発した¹²⁾。本稿では乾燥保存型積層線維芽細胞シート（Dry sheet）の創傷治癒促進効果の機序とDry sheetの特徴について概説する。

2. Dry sheetの創傷治癒促進効果の機序

細胞シート移植治療による創傷治癒促進の重要な作用の一つは生細胞から分泌される成長因子やサイトカインによるパラクライン効果と考えられてきた。そのため、研究開始当初は、乾燥によって死んだ細胞から成るDry sheetは創傷治癒には限定的な効果しかないのではないかと懐疑的であった。しかし、驚くべきことに、糖尿病マウス全層皮膚欠損モデルでの治療実験において、自家または他家細胞で作製したDry sheetは無治療群に比べて有意な創傷治癒の促進を示した。さらに、Dry sheetによる創傷治癒促進効果は、積層線維芽細胞シート（Living sheet）に比べても大きな差はなかった。組織学的な観察からDry sheet移植後早期の段階で、無治療群に比べて、創縁の微小血管数および表皮角化細胞の有意な増加が認められた。このことは、Dry sheetから生理活性物質が放出され、表皮角化細胞や血管内皮細胞などの創傷部周囲の細胞を刺激し、創傷治癒を促したことを示唆している。さらにDry sheetの利点として、Living sheetは培養皿から移植する際には移植用支持体を必要とするが、Dry sheetはシート形状を保持したまま鑷子で把持でき、

操作性に優れていた (図 1)。

In vitro の検討において, Dry sheet は乾燥によって細胞膜が損傷し, 不可逆的に生命活動が停止した死細胞であることが確認されている。そのため, Dry sheet は従来の Living sheet のように VEGF や hepatocyte growth factor (HGF) などの成長因子を持続的に分泌することはできない。しかし, Dry sheet の細胞膜の損傷を確認した乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase ; LDH) 放出試験結果から, 再水和された Dry sheet は LDH だけでなく生理活性物質も細胞内から放出しているのではないかと考え, Dry sheet を培養液に浸漬した上清中の成長因子を測定した。その結果, Dry sheet の浸漬液には VEGF, HGF だけでなく, 強力な組織修復因子である線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth

factor-2 : FGF-2/bFGF)¹³⁾ や, ダメージ関連分子パターン (damage associated molecular patterns ; DAMPs) の代表格でかつ創傷治癒促進にも関与する高移動度グルーブボックス蛋白質 1 (high mobility group box protein1 ; HMGB1)¹⁴⁻¹⁹⁾ を高レベルに検出した。注目すべきは, Dry sheet に保持された細胞質内の FGF-2 と核内の HMGB1 は, Living sheet からは分泌されないが, 再水和させることによって Dry sheet から放出される点である。次に, Dry sheet から放出される生理活性物質の生物活性について線維芽細胞を用いて検討したところ, Dry sheet の浸漬液は Living sheet の浸漬液に比べ有意な細胞増殖を示し, また, 線維芽細胞からの VEGF, HGF の産生も有意に促進させた。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ことから, 特に FGF-2 の作用が重要であることが示唆された。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, 一般的に細胞外への積極的な分泌は行われておらず, FGF-2 の主な生理機能としては傷害を受けた細胞や死細胞から放出され, 組織修復を促す重要な細胞増殖因子として知られている²⁰⁻²³⁾。間葉系幹細胞移植治療に関する研究では, 損傷した間葉系幹細胞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ている²³⁾。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 に関する報告はなかった。

以上の基礎検討から, Dry sheet は VEGF, HGF だけでなく生理活性を有する FGF-2 を保持し, 創部に貼付された直後から保持している成長因子を放出すること, そして, Dry sheet から放出された成長因子は創部の表皮角化細胞や血管内皮細胞を増加させる直接的な作用と, 放出された FGF-2 により創周囲の線維芽細胞を活性化して VEGF や HGF の持続的な分泌を促す間接的な作用の両面から創傷治癒を促進するという機序が考えられた¹²⁾ (図 2)。

3. Dry sheet の生体内での局在

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り, また他家細胞シートの貼付によって多少の局所免疫を生じさせる

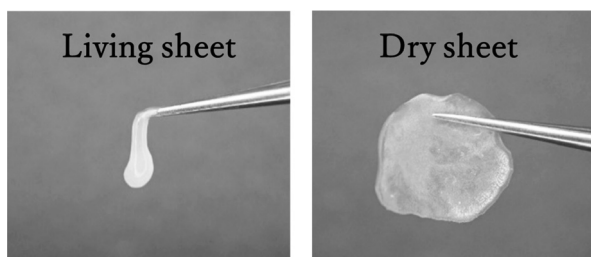


図 1

Living sheet は培養皿から移植する際には移植用支持体を必要とする。一方, Dry sheet は乾燥によってある程度の硬度を有したままシート形状を保持し, 容易に鑷子で把持しての移植が可能である。

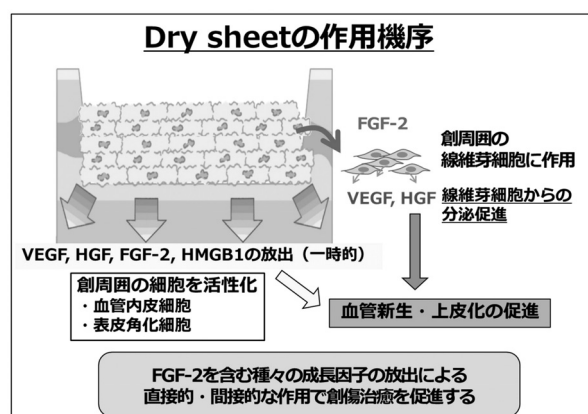


図 2

従来の生きた積層線維芽細胞シートは, 創傷部に移植後, 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 sheet は創傷部に移植後, FGF-2 を含む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。

が、創傷治癒に悪影響を与えないことが報告されている⁹⁾。同研究において、ルシフェラーゼ発現線維芽細胞を用いたin vivoイメージング解析が行われ、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は消失し、生きた積層線維芽細胞シートは生体内において永久的には生着しないことが確認されている⁹⁾。Dry sheetに関しては、移植後1日目には創部全体を覆うように局在しているが、経過に伴い徐々にシート状構造が崩壊していく。しかし、Dry sheetは創部からは脱落せず、形成された痂皮または表皮組織の直下に存在し、Dry sheet内への好中球やマクロファージの浸潤が移植後早期から認められる。そして、創傷治癒後の組織像において、明らかなDry sheetの遺残は認められていない。一方で、ヒトの他家移植を想定し、マウス皮膚潰瘍モデルでヒト培養表皮細胞シートを用いた研究においては、創傷治癒の過程でヒト培養表皮細胞シートは生体外に排出されることが確認されている¹¹⁾。線維芽細胞由来のDry sheetは、自然免疫により異物として貪食され、生体に遺残しないことが推察される。安全性を含め更なる研究が必要ではあるが、Dry sheetは体表面だけでなく生体内の臓器にも悪影響なく使用できる可能性がある。

4. Dry sheetの保存安定性

Dry sheetの保存安定性（1日及び1，2，3，4週間）を検討したところ、室温（23℃）ではFGF-2やHMGB1は漸減したが、冷蔵（4℃）保存では各成長因子に大きな変化はないことを確認している¹²⁾。臨床応用に向けては、Dry sheetの保存安定性の更なる検討が必要と考えられる。

5. Dry sheetに適したヒト細胞源の探索

従来の生きた細胞シートは移植細胞からの様々な成長因子の持続的な分泌に焦点が当てられているのに対し、Dry sheetでは主に細胞内のFGF-2が治療効果に重要な役割を果たしている。しかし、細胞シートとして使用される様々な細胞の細胞内FGF-2レベルを比較した研究はなく、ヒトではどの細胞がDry sheetに適しているのか不明であった。我々は

臨床用または前臨床試験用の細胞シートとして報告のある7種類のヒト細胞（口腔組織由来線維芽細胞、皮膚由来線維芽細胞、歯髄幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯静脈由来血管内皮細胞、骨格筋芽細胞、表皮角化細胞）について細胞内FGF-2レベル及びその生物活性を指標にDry sheetに適したヒトの細胞種を探索した。細胞内FGF-2は線維芽細胞、歯髄幹細胞、間葉系幹細胞などの間葉系細胞で高かったのに対し、血管内皮細胞、骨格筋芽細胞、表皮角化細胞では低く、線維芽細胞と比較して約1/4以下の値であった。さらに、線維芽細胞、歯髄幹細胞、間葉系幹細胞から作製したDry sheetを用いて、成長因子の放出量や血管内皮細胞を用いた生物活性を検討したところ、線維芽細胞が最も優れていた²⁴⁾。また、FGF-2中和抗体による阻害実験から、ヒトDry sheetの生物活性は主にFGF-2の作用であることが示された。臨床応用の観点からDry sheetに最適な細胞を考えた場合、細胞内FGF-2含量が高いことに加え、細胞増殖が速く、取り扱いが容易で、入手しやすく、培養コストが低いなどの条件が必要である。これらの条件を満たす線維芽細胞は、ヒトDry sheetの臨床応用に理想的な細胞源であると考えられた。

6. Dry sheetの今後の展望

これまでの著者らの基礎研究から、積層線維芽細胞シートの乾燥保存は細胞シートの利便性を高めるだけでなく、十分な創傷治癒促進効果を有することが示された。Dry sheetの臨床応用を見据えると、シートのサイズや規格の調整、滅菌工程の検討、安全性の検証などの様々な課題解決が必要となるが、難治性皮膚潰瘍を対象とした創傷被覆材として研究開発を進めていく計画である。また、著者の所属する研究室では、積層線維芽細胞シート（Living sheet）は難治性皮膚潰瘍の治療だけでなく、気管支断端瘻、腭液瘻、消化管縫合不全などの重篤な術後合併症予防にも有効であることを報告してきた²⁵⁻²⁷⁾。Dry sheetは従来のLiving sheetより操作性にも優れ、生体内での創傷治癒の促進にも効果が期待できることから、重篤な術後合併症の予防を目的とした外科手術時の組織の補強材としての応用も期待される。Dry sheetは冷蔵もしくは常温での保存が可

能であるという点で、冷凍保存に比べて簡便であり、特に長期保存が可能となることで用時調製の必要がなく、必要な時に迅速に使用できるというメリットが生まれるため、いつでもどこでも使える「細胞絆創膏」となることが期待される。

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）、濱野公一先生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、多くの先生方、共同研究者の先生方に感謝申し上げます。

山口大学医学会の定める利益相反にかかわる開示事項はありません。

引用文献

- 1) Matsuura K., Utoh R., Nagase K., Okano T. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J Control Release* 2014 ; 190 : 228-239.
- 2) Chang D., Fan T., Gao S., Jin Y., Zhang M., Ono M. Application of mesenchymal stem cell sheet to treatment of ischemic heart disease. *Stem Cell Res. Ther* 2021 ; 12 : 384.
- 3) Kanzaki M., Sekine, H., Takagi, R. & Yamato, M. Bioartificial pleura using allogenic cell sheet for closing of lung air leakage. *JTCVS Tech* 2020 ; 4 : 336-340.
- 4) Ohki T., Yamato M., Murakami D., Takagi R., Yang J., Namiki H., Okano T., Takasaki K. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 2006 ; 55 : 1704-1710.
- 5) Ueno K., Takeuchi Y., Samura M., Tanaka Y., Nakamura T., Nishimoto A., Murata T., Hosoyama T., Hamano K. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci. Rep* 2016 ; 6 : 28538.
- 6) Takeuchi Y., Ueno K., Mizoguchi T., Samura M., Harada T., Oga A., Murata T., Hosoyama T., Morikage N., 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.
- 7) Mizoguchi T., Ueno K., Takeuchi Y., Samura M., Suzuki R., Murata T., Hosoyama T., Morikage N., 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.
- 8) Mizoguchi T., Suehiro K., Ueno K., Ike S., Nagase T., Samura M., Harada T., Kurazumi H., Suzuki R., Harada K., Takami T., Morikage N., 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.
- 9) Nagase, T. et al. Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice. *Am. J. Transl. Res* 2020 ; 12 : 2652-2663.
- 10) Ueno K., Ike S., Yamamoto N., Matsuno Y., Kurazumi H., Suzuki R., Katsura S., Shirasawa B., Hamano K. Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing. *Biochem Biophys Rep* 2021 ; 28 : 101169.
- 11) Sakamoto, M. et al. Human cultured epidermis accelerates wound healing regardless of its viability in a diabetic mouse model. *PLOS ONE* 2020 ; 15 : e0237985.
- 12) Yutaro Matsuno, Masashi Yanagihara, Koji Ueno, Toshiro Saito, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Shunsaku Katsura, Atsunori Oga, Kimikazu Hamano. Dry preserved multilayered fibroblast cell sheets are a new manageable tool for regenerative medicine to

- promote wound healing. *Sci Rep* 2020 ; **12** : 12519.
- 13) 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* 2007 ; **100** : 1100-1108.
 - 14) Harris, H. E. & Raucci, A. Alarmin (g) news about danger : Workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 2006 ; **7** : 774-778.
 - 15) Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002 ; **418** : 191-195.
 - 16) 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* 2011 ; **108** : 6609-6614.
 - 17) 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* 2015 ; **194** : 1996-2003.
 - 18) 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* 2015 ; **5** : 11008.
 - 19) Wilgus, T. A. Alerting the body to tissue injury : The role of alarmins and DAMPs in cutaneous wound healing. *Curr. Pathobiol. Rep* 2018 ; **6** : 55-60.
 - 20) Gajdusek, C. M., & Carbon, S., Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol* 1989 ; **139** : 570-579.
 - 21) McNeil, P. L., Muthukrishnan, L., Warder, E., & PA D'Amore, P. A. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol* 1989 ; **109** : 811-822.
 - 22) D'Amore, P. A. Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer Metastasis Rev* 1990 ; **9** : 227-238.
 - 23) 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* 2015 ; **24** : 1623-1634.
 - 24) Masashi Yanagihara, Yutaro Matsuno, Koji Ueno, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Toshiki Tanaka, Kimikazu Hamano. Fibroblasts are the most suitable cell source for regenerative medicine due to their high intracellular fibroblast growth factor 2 content. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2023 ; **35** : 101510.
 - 25) Yoshimine, S. et al. Autologous multilayered fibroblast sheets can reinforce bronchial stump in a rat model. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg* 2021 ; **34** : 349-358.
 - 26) Iwamoto, K. et al. Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis. *Am. J. Transl. Res* 2021 ; **13** : 1257-1268.
 - 27) Naohiro Yamamoto, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Hiroshi Kurazumi, Yuya Tanaka, Atsunori Oga, Mototsugu Shimokawa, Eijiro Harada, Toshiki Tanaka, Kimikazu Hamano. Allogenic multilayered fibroblast sheets promote anastomotic site healing in a rat model of esophageal reconstruction. *Am. J. Transl. Res* 2023 ; **15** : 3217-3228.

Development of Dry Preserved Fibroblast Cell Sheets for Regenerative Medicine to Promote Wound Healing

Yutaro MATSUNO

Division of Cardiovascular Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Tokuyama Central Hospital, 1-1 Koda-cho, Shunan, Yamaguchi 745-8522, Japan

SUMMARY

To popularize cell sheet transplantation therapy, it is necessary to develop an easy-to-use cell sheet preservation method. Because cell viability determines therapeutic efficacy, cryopreservation, with a high viability rate, has been considered for preservation. We developed dry, preserved, multilayered fibroblast cell sheets (dry sheets) as a novel cell sheet preservation method. Dry sheets

consist of dead cells with damaged cell membranes. However, dry sheets using allogeneic cells promote angiogenesis and wound healing in a full-thickness skin defect model of diabetic mice through a novel mechanism of releasing intracellular growth factors by rehydration. The growth factors released from dry sheets had physiological activity, mainly through the action of fibroblast growth factor-2 (FGF-2), as demonstrated by inhibition experiments using FGF-2 neutralizing antibodies. Growth factors in dry sheets were stable for at least one month when stored in a refrigerator. In our investigation of the optimal cell source for human dry sheets, fibroblasts were considered the ideal cell source for because of their high FGF-2 content, rapid cell proliferation, easy handling and availability, and low culture cost. Compared to conventional cell sheets, dry sheets are easier to handle and preserve, which is promising for treating cutaneous ulcers and performing tissue reinforcement during surgery.