

学位論文（博士）

Wound-healing effects of frozen-thawed allogeneic
fibroblast sheet transplantation and xenogeneic fibroblast
cell sheet transplantation cultured on a new substrate

（新しい基材上で培養した
凍結融解同種他家線維芽細胞シート移植および
異種線維芽細胞シート移植の創傷治癒効果）

氏名 須藤 優太郎

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 7 年 6 月

目 次

1. 要旨	3
2. 序論	4
3. 材料と方法	5
4. 結果	9
5. 考察	20
6. 結論と限界	23
7. 謝辞	24
8. 参考文献	25

要旨

本研究は、新規基材を用いて培養した凍結融解線維芽細胞シートの、同種他家移植および異種移植モデルマウスにおける皮膚潰瘍に対する治療効果を検討することを目的とした。細胞シートは非常に脆弱であるため、移植には工夫が必要である。本研究では、細胞培養から凍結保存、融解後の細胞シート移植までの一連の操作を容易に行うために、新規基材「CY-1」（親水性処理を施した熱可塑性樹脂フィルム）を用いる手法を検討した。

本研究では、線維芽細胞を CY-1 上で培養後、細胞保存液とともに 3D フリーザーで凍結保存した。融解後の線維芽細胞シートを標的部位へ移植し、移植時に CY-1 を除去した。その結果、CY-1 上で培養・凍結融解した同種他家線維芽細胞シートは、糖尿病モデルマウス (C57BL/6) の皮膚欠損に対して、シートを移植しなかった対照群と比較し、有意に高い治療効果を示し、移植 15 日目には毛包再生も確認された。また、免疫染色を行ったところ、移植 15 日目の時点で、同種他家線維芽細胞シート移植群では対照群に比べて有意に CD3 陽性細胞数が少なかった（同種他家移植群 vs. 対照群：302 ± 68.7 vs. 389 ± 30.9 [p = 0.03]）。

さらに、融解 24 時間後の CY-1 上で培養した凍結融解ヒト線維芽細胞と、非凍結ヒト線維芽細胞における細胞生存率および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 分泌能は同等であった。一方、肝細胞増殖因子 (HGF) 分泌能は、凍結融解したヒト線維芽細胞において有意に高かった（非凍結 vs. 凍結融解：839 ± 50.6 vs. 1,750 ± 118 [p < 0.01]）。また、CY-1 上で培養・凍結融解したヒト線維芽細胞シートは、免疫不全マウスの皮膚欠損に対して、対照群と比較して有意に高い治療効果を示した。異種移植した線維芽細胞シート周囲のマウス組織において、移植 2 日目には対照群よりも有意に高い HGF 活性が認められた（異種移植群 vs. 対照群：600 ± 116 vs. 437 ± 71 [p < 0.05]）。以上の結果から、CY-1 上で培養・凍結融解した線維芽細胞シートは、難治性皮膚潰瘍に対する有望な治療法となる可能性が示唆された。

序論

慢性潰瘍は、4週間から3か月以上にわたって治癒が困難な創傷と定義される¹。この疾患は米国において約650万人に影響を及ぼし、年間2,500億ドルの医療費を要するとされている²。また、患者の機能低下や生活の質（QOL）の低下に大きな影響を及ぼす。慢性潰瘍の多くは、静脈性潰瘍、動脈性下腿潰瘍、糖尿病性潰瘍、または褥瘡に分類され³、高齢化や糖尿病の増加に伴い、今後さらに多くの患者が罹患すると予想される。そのため、難治性皮膚潰瘍に対する新たな治療法の開発が急務となっている。

我々はこれまで、難治性皮膚潰瘍に対する細胞シート技術を用いた細胞移植治療を研究してきた。具体的には、自家末梢血単核球と線維芽細胞を組み合わせた混合細胞シートを開発し、動物実験において創傷治癒効果を報告した⁴⁻⁶。さらに、静脈うっ滞による難治性皮膚潰瘍患者を対象に、自家末梢血単核球と線維芽細胞を組み合わせた混合細胞シートを用いた臨床研究も実施した⁷。しかしながら、登録患者の半数において高品質の細胞を得ることができず、細胞シート移植を実施できなかった。この課題を克服するため、自家細胞ではなく、細胞シート移植を必要とする患者に向けた同種他家線維芽細胞シートに着目し、マウスモデルにおいて自家線維芽細胞シートと同種他家線維芽細胞シートが同等の治療効果を示すことを明らかにした⁸。

また、製造コストの削減および細胞シート移植の利便性向上を目的に、3Dフリーザーを用いた線維芽細胞シートの三次元凍結保存技術を開発した⁹。凍結保存後に解凍しても、同種他家線維芽細胞シートはマウスモデルにおいて良好な創傷治癒効果を示した¹⁰。

しかし、細胞シートの移植は複雑な手技を要する。通常、培養皿から剥離した細胞シートは、スパチュラやスプーン、ピペット、支持体などのツールを用いて目的の部位に移植される。

本研究では、細胞培養から凍結保存、解凍後の移植に至る一連のプロセスを簡便化するため、共同開発した新規基材（開発コードCY-1、セントラル硝子株式会社より提供）を用いた。この新規基材上で培養した線維芽細胞は、3Dフリーザーを用いて超低温で凍結保存され、解凍後は直ちにマウスモデルに移植され、移植時に基材を除去した。本手法による、マウスの同種他家線維芽細胞シートの糖尿病モデルマウスの皮膚欠損に対する治療効果を検討した。また、ヒト線維芽細胞シートを免疫不全マウスに移植する異種移植モデルにおける治療効果を検討した。

細胞シートの治療効果は、VEGFやHGFなどの成長因子によるパラクリン効果によるものと考えられる^{4-6,10,13,14}。そのため、本研究では凍結前後での線維芽細胞シートのVEGFおよびHGFの分泌量を測定した。

本研究は、新規基材を用いることで製造コストの削減および細胞シート移植の利便性向上を可能にすることを初めて報告するものである。

材料と方法

動物

C3H/He 系および C57BL/6 系雄マウスは日本 SLC 株式会社（静岡、日本）より購入し、NOD/SCID 系雄マウスは九動株式会社（佐賀、日本）より購入した。緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するトランスジェニックマウス（C57BL6/Tg14 系統）は、大阪大学微生物病研究所（大阪、日本）の岡部勝教授より提供を受けた¹¹。

すべての動物実験は山口大学宇部地区動物使用計画審査委員会の承認（承認番号：31-093）を受け、承認されたガイドラインに従って実施した。また、本研究は ARRIVE ガイドラインにも準拠している。糖尿病モデルマウスを作製するため、C57BL/6 系雄マウスにストレプトゾトシン（55 mg/kg）を 5 日間連続で腹腔内投与し、血糖値が 200 mg/dL 以上の個体を移植対象とした。

マウス線維芽細胞シート

マウスの尾部皮膚からコラゲナーゼ（富士フイルム和光純薬株式会社、日本）を用いて線維芽細胞を単離し、CTS™ AIM V™ 培地（Thermo Fisher Scientific、米国）と 10% ウシ胎児血清（FBS）（Thermo Fisher Scientific）を含む培地で培養した。

滅菌処理した、親水性処理後の熱可塑性樹脂フィルムである CY-1（セントラル硝子株式会社、日本）を、48 ウェルプレートの底面に設置した。CY-1 はウェルサイズに適合している。初代培養線維芽細胞を、 2.5×10^5 cells/0.8mL/well で播種し、5% CO₂ 環境下、37°C で 2 日間培養した。一方、凍結解凍後の線維芽細胞シートは 1 日間のみ培養した。

培養終了後、48 ウェルプレートから培地を除去し、各ウェルに Bambanker® hRM（120 µL/well）（GC LYMPHOTEC 株式会社、日本）を添加した。その後、プレートを 3D フリーザー（株式会社コガサン、日本）に設置し、-35°C で 20 分間凍結させた後、-150°C のディープフリーザーに移動し長期保存した。凍結保存した細胞は室温 20 分で解凍した。

単離したマウス線維芽細胞の特性を確認するため、形態観察および蛍光染色を行い、その結果を Supplementary Figure 1A-C に示した。

ヒト線維芽細胞

ヒト線維芽細胞は、親知らず抜歯時に廃棄される歯肉組織から単離し、CTS™ AIM V™ SFM 培地（Thermo Fisher Scientific）および HFDM-1（+）（株式会社細胞科学研究所、日本）を 1:1 の割合で混合した培地に、2% NeoSERA（日本バイオメディカル株式会社、日本）を添加し、5% CO₂ 環境下、37°C で培養した。

本研究は山口大学医学部附属病院治験及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会の承認（承認番号 #2020-123, #2022-176）を受けており、すべての研究参加者からインフォームド・コンセントを取得した。また、本研究はヘルシンキ宣言に準拠して実施し、UMIN 臨床試験登録（UMIN-CTR: UMIN000042301, UMIN000049999）に登録されている。

単離したヒト線維芽細胞の特性を確認するため、形態観察および蛍光染色を行い、その結果を Supplementary Figure 1D-F に示した。

ヒト線維芽細胞シート

滅菌処理した CY-1 を 48 ウェルプレートに設置した。ヒト線維芽細胞は、 2.5×10^5 cells / 0.8mL/well で播種し、CTS™ AIM V™ SFM および HFDM-1 (+) を 1:1 で混合した培地に 2% NeoSERA を添加し、5% CO₂環境下、37°C で 1 日間培養した。

凍結解凍後の線維芽細胞シートも 1 日間培養した。培養終了後、ウェルプレートから培地を除去し、各ウェルに Bambanker® hRM (120 µL/ウェル) を添加した。その後、プレートを 3D フリーザーに設置し、-35°C で 30 分間凍結させた後、-150°C のディープフリーザーに移動し長期保存した。凍結保存した細胞は室温 20 分で解凍した。

組織学的解析

ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 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を行うため、皮膚組織または線維芽細胞シートを回収し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。組織切片 (厚さ 3 µm) を作製し、ガラススライドに貼付後、キシレンで脱パラフィン化し、段階的エタノール脱水を行った。

抗原賦活化処理として、Target Retrieval Solution (S1699; Dako, デンマーク) を用い、100°C で 30 分間加熱処理を行った。続いて、ブロッキングバッファー (X0909; Dako) を用いて室温で 20 分間インキュベートした。DAB 染色は Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3467; Dako) を用い、30 秒間行った。

使用した一次抗体は以下の通り：

- 抗 CD3 抗体 (ab16669; Abcam、英国)
- 抗 GFP pAb (598; MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., 日本)
- 抗活性型 HGF 抗体 (t8E4 クローン、MABS2140-100UG; MERCK)
 - 抗体精製キット (# ab102778; Abcam) を用いて精製
 - DyLight® 550 標識キット (# ab201800; Abcam) を用いて蛍光標識化
- 二次抗体：
 - ヤギ抗ウサギ IgG H&L (DyLight® 550 標識、ab96884; Abcam)
 - HRP 標識抗 HLA Class I 抗体 (ab33256; Abcam)

マウスおよびヒト線維芽細胞の蛍光染色では、4% パラホルムアルデヒド固定後、0.1% Triton-X で透過処理を行った。続いて、一次抗体 (抗ビメンチン抗体、ab92547; Abcam) の有無で免疫反応を行い、二次抗体 (ヤギ抗ウサギ IgG H&L DyLight® 550 標識) で処理した。細胞核は DAPI (1351303, Bio-Rad、米国) で染色した (Supplementary Figure 1B、1C、1E、1F)。

すべての組織像は BZ-X710 顕微鏡 (Keyence, 日本) で撮影し、BZ-X Analyzer (Keyence) で解析を行った。

細胞生存率評価

初代線維芽細胞（パッセージ 2）を 48 ウェルプレートに 2.5×10^5 cells/well の密度で播種し、様々な条件で培養した細胞の生存率を評価するために、KATAMARI ATP アッセイ試薬（東洋ビーネット株式会社，日本）と培地を 1:1 で混合し、800 μ L/ウェル添加した。反応液の上清（100 μ L/ウェル、n = 4）を 96 ウェルプレートに移し、測定を行った（FlexStation 3、Molecular Devices、米国）。測定データは以下の 3 条件で比較した：

- ・ 非凍結 24 時間培養（Non-frozen 24 hr, 100%基準）
- ・ 解凍直後（Just after thawed）
- ・ 解凍 24 時間後（24 hr after thawing）

ヒト線維芽細胞シートについても、同様の方法で評価した。

マウス ELISA

マウス VEGF および HGF の測定には、ELISA キット（#MMV00、#MHG00; R&D Systems、米国）を用いた。

上記のマウス線維芽細胞シート作製のために 48 時間培養した時の培養上清を回収した。このとき、細胞を播種して、24 時間培養した時の培養液（「Non-frozen 24 hr」）を VEGF および HGF 評価のために回収し、培地交換後さらに 24 時間培養した時の培養液を回収した（「Non-frozen 48 hr」）。マウス線維芽細胞シートを凍結保存（上述の方法）後、解凍して 24 時間培養した時の培養液を回収した（「24 hr after thawing」）。なお、「Non-frozen 48 hr」と「24 hr after thawing」は、総培養時間がともに 48 時間となるように調整した。すべての条件において、培養 24 時間ごとに培養液を採取した。上記の条件で回収した培養液の濃度から、新鮮な培養液の濃度を引いた値を測定値とした。

ヒト ELISA

ヒト VEGF および HGF の測定には、ELISA キット（#DVE00、#DHG00B; R&D Systems）を使用した。方法はマウス ELISA と同様である。

皮膚創傷治癒モデルと細胞シート移植

CY-1 の有無、および、凍結の有無が異なる同種他家線維芽細胞シートを糖尿病マウスの皮膚創傷治癒モデルに移植した。

C57BL/6 糖尿病マウスを 2.0%イソフルラン吸入麻酔下で背部に 6mm 全層皮膚欠損創を作製した。創傷部位は ADAPTIC（#2012; Acelity, San Antonio, TX, USA）および Derma-aid®（ALCARE, 東京, 日本）で 24 時間覆い、その後 Airwall Fuwari（#MA-E050-FT; Kyowa, 大阪, 日本）で被覆し、Silklytex バンデージ（#11,893; ALCARE）で固定した。

創傷は 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 日目にデジタルカメラで撮影し、ImageJ（NIH, USA）を用いて創傷面積を計測した。創傷収縮率は以下の式で算出した：

Day X の創傷収縮率 = $1 - (\text{Day X の創傷面積} / \text{Day 0 の創傷面積})$

ヒト線維芽細胞シートの移植（異種移植モデル）では、NOD/SCID マウスに対し、CY-

1 を使用し培養し凍結解凍したヒト歯肉由来線維芽細胞シートを移植した。その他の方法はマウスと同様とした。

GFP 発現線維芽細胞の移植

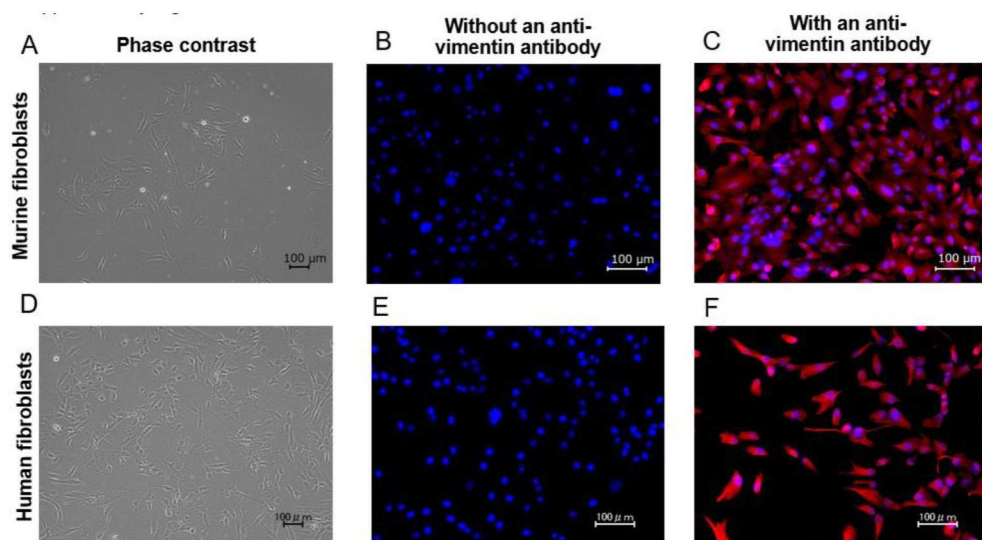
GFP トランスジェニックマウス (C57BL6/Tg14) の尾部皮膚より線維芽細胞を単離し、上述の方法で細胞シートを作製した。これを C57BL/6 糖尿病マウスの背部創傷へ移植した。

統計解析

データは**平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) **として表記。比較解析には以下の統計手法を用いた：

- ・ 2 群間比較：両側検定 (two-tailed unpaired t-test)
- ・ 3 群以上の比較：一元配置分散分析 (ANOVA, repeated measures) およびボンフェローニ補正
- ・ カテゴリカルデータの比較：フィッシャーの正確確率検定

統計解析は JMP Pro16 (JMP Statistical Discovery LLC.) を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計的有意水準とした：* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



Supplementary Figure 1. 分離されたマウスおよびヒト線維芽細胞の観察。

単離されたマウス線維芽細胞を位相差顕微鏡および蛍光染色により観察。

(A)(B)(C) 単離マウス線維芽細胞。

(D)(E)(F) 単離ヒト線維芽細胞。

(A)(D) 位相差顕微鏡画像 (スケールバー = 100 μm)。

(B)(E) 抗ビメンチン抗体を使用しない蛍光染色 (DAPI: 青, スケールバー = 100 μm)。

(C)(F) 抗ビメンチン抗体を使用した蛍光染色 (DAPI: 青, ビメンチン: 赤, スケールバー = 100 μm)。

すべての蛍光染色実験は、抗ビメンチン抗体の有無を除いて同じプロトコルで実施。

結果

凍結保存したマウス線維芽細胞シートの生存率および成長因子の分泌

C3H/He マウス由来の線維芽細胞を、CY-1 を有りと無しの条件下で 24 時間培養したところ、CY-1 の有無による細胞生存率に違いは認められなかった (Figure 1A 左)。次に、線維芽細胞を、3D フリーザーを用いて凍結し、 -150°C で 24 時間保存したところ、解凍直後の細胞生存率は、約 20%であったが、CY-1 の有無による細胞生存率の違いは認められなかった (Figure 1A 中央)。さらに、解凍して 24 時間培養すると、細胞生存率は約 50%まで回復し、CY-1 の有無による違いは認められなかった (Figure 1A 右)。

CY-1 が成長因子の分泌に与える影響を確認するため、VEGF および HGF の濃度を以下の 3 つの条件で測定した。「細胞を播種して、24 時間培養した時の培養液 (Non-frozen 24 hr)」、「培地交換後さらに 24 時間培養した時の培養液 (Non-frozen 48 hr)」、「解凍して 24 時間培養した時の培養液 (24 hr after thawing)」である。その結果、VEGF および HGF の分泌量には CY-1 の有無による違いは認められなかった。VEGF の分泌量は、「Non-frozen 48 hr」および「24 hr after thawing」で「Non-frozen 24 hr」と比較して低下する傾向が見られた。一方、HGF の分泌量はすべての条件において一定であった (Figure 1B および 1C)。

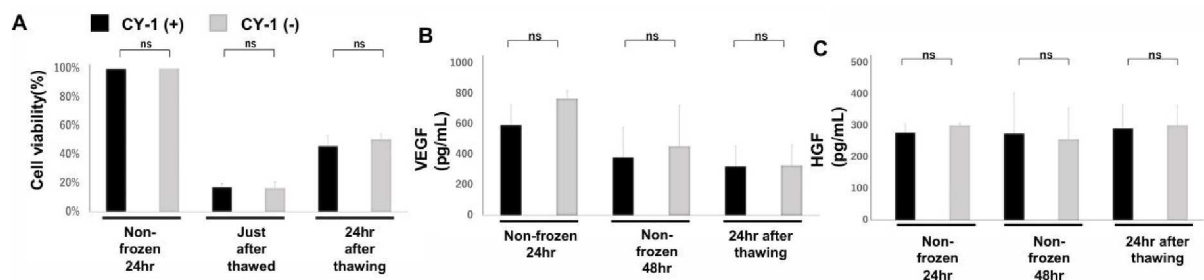


Figure 1. CY-1 の有無による C3H/He マウス線維芽細胞の凍結・解凍後の機能評価。
(A) CY-1 の有無による C3H/He 線維芽細胞の凍結・解凍後の細胞生存率 (n = 4)。
(B), (C) C3H/He 由来線維芽細胞シートの上清中における VEGF および HGF 濃度 (n = 4)。

「Non-frozen 24 hr」は、細胞を播種し 24 時間培養したもの。

「24 hr after thawing」は、線維芽細胞シートを解凍後、培地交換を行い 24 時間培養したもの。

「Just after thawed」は、線維芽細胞シートを解凍直後に評価したもの。

「Non-frozen 48 hr」は、細胞を播種し 24 時間培養後、培地交換を行いさらに 24 時間培養したもの。

凍結解凍した同種他家線維芽細胞シート（CY-1 添加）の皮膚創傷治癒マウスモデルにおける治療効果

糖尿病 C57BL/6 マウスを用いた皮膚創傷治癒モデルにおいて、4 つの群で治療実験を実施した。対照群（無治療）と、同種他家線維芽細胞シートを移植した 3 つの群（非凍結 CY-1 培養群、凍結解凍 CY-1 培養群、凍結解凍非 CY-1 培養群）である。マウスの背部に皮膚欠損を作製し、撮影を行った。凍結解凍した同種他家線維芽細胞シートは、解凍直後に皮膚欠損部へ移植した。創傷部の観察は、0 日目、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、9 日目、11 日目、13 日目、15 日目に実施した（Figure 2A）。

創傷治癒率（%）は、すべての治療群（非凍結 CY-1 培養群、凍結解凍 CY-1 培養群、凍結解凍非 CY-1 培養群）において、対照群と比較して有意に高かった。具体的には、

- 1 日目：対照群（ -8.31 ± 12.4 ）に対し、治療群では 6.28 ± 7.75 （ $p = 0.005$ ）、 6.86 ± 7.54 （ $p = 0.003$ ）、 6.25 ± 7.74 （ $p = 0.005$ ）と有意な差が認められた。
- 3 日目：対照群（ 30.76 ± 10.3 ）に対し、治療群では 40.88 ± 7.31 （ $p = 0.022$ ）、 40.36 ± 5.63 （ $p = 0.032$ ）、 41.95 ± 5.51 （ $p = 0.01$ ）と有意な差が認められた。
- 5 日目：対照群（ 47.79 ± 8.33 ）に対し、治療群では 57.34 ± 8.73 （ $p = 0.028$ ）、 57.45 ± 6.80 （ $p = 0.026$ ）、 57.73 ± 4.47 （ $p = 0.01$ ）と有意な差が認められた。
- 7 日目：対照群（ 62.07 ± 5.27 ）に対し、治療群では 66.31 ± 5.21 （ $p = 0.25$ ）、 68.81 ± 5.71 （ $p = 0.026$ ）、 71.05 ± 4.27 （ $p = 0.002$ ）と有意な差が認められた。

9 日目、11 日目、13 日目、15 日目においては、4 群間に有意な差は認められなかった（Figure 2B）。

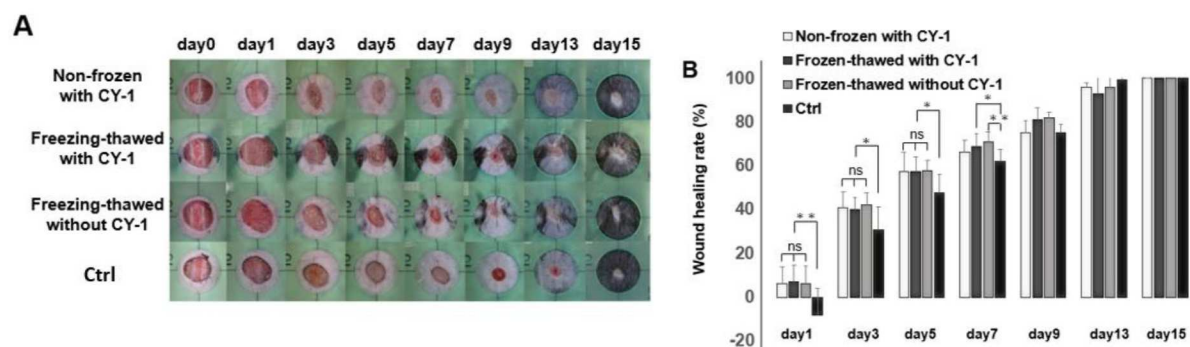


Figure 2. 糖尿病 C57BL/6 マウスの皮膚創傷治癒モデルにおける凍結解凍した同種他家線維芽細胞シートの治療効果。

(A) 創傷の代表的な肉眼写真（0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 日目）。

Nonfrozen with CY-1: CY-1 上で培養した非凍結同種他家線維芽細胞シート群。

Freeze-thawed with CY-1: CY-1 上で培養した凍結・解凍同種他家線維芽細胞シート群。

Freeze-thawed without CY-1: CY-1 無しで培養した凍結・解凍同種他家線維芽細胞シート群。

Ctrl: コントロール群（各群 $n = 10$ ）。

(B) 4 つの群間での同種他家線維芽細胞シート移植後の創傷治癒率の比較（各日）。

同種他家細胞シート移植後の創傷の病理組織学的検査

病理組織学的解析は 13 日目に実施した。H&E 染色の結果、対照群では毛包の再生が認められなかったが、同種他家線維芽細胞シートを移植した 3 群では毛包の再生が確認された (H&E 染色、Figure 3A)。また、Azan 染色の結果、対照群では膠原線維の割合が同種他家線維芽細胞シート移植した 3 群よりも少ない結果であった (Figure 3A)。病理学的解析から、対照群の創傷治癒過程は、同種他家線維芽細胞シート移植群よりも遅延していた。なお、同種他家線維芽細胞シート移植の 3 群間において、組織学的所見に有意な差は認められなかった (Figure 3A)。

移植部位周囲における T リンパ球の集積を評価するため、CD3 陽性細胞の数を 5 日目および 13 日目に解析した (Figure 3B)。その結果、5 日目では有意な差は認められなかった (642 ± 121 vs. 607 ± 121 [$p = 0.70$])。しかし、13 日目において、凍結解凍 CY-1 培養群は、対照群と比較して CD3 陽性細胞数が有意に低下していた (302 ± 68.7 vs. 389 ± 30.9 [$p = 0.03$]) (Figure 3C)。

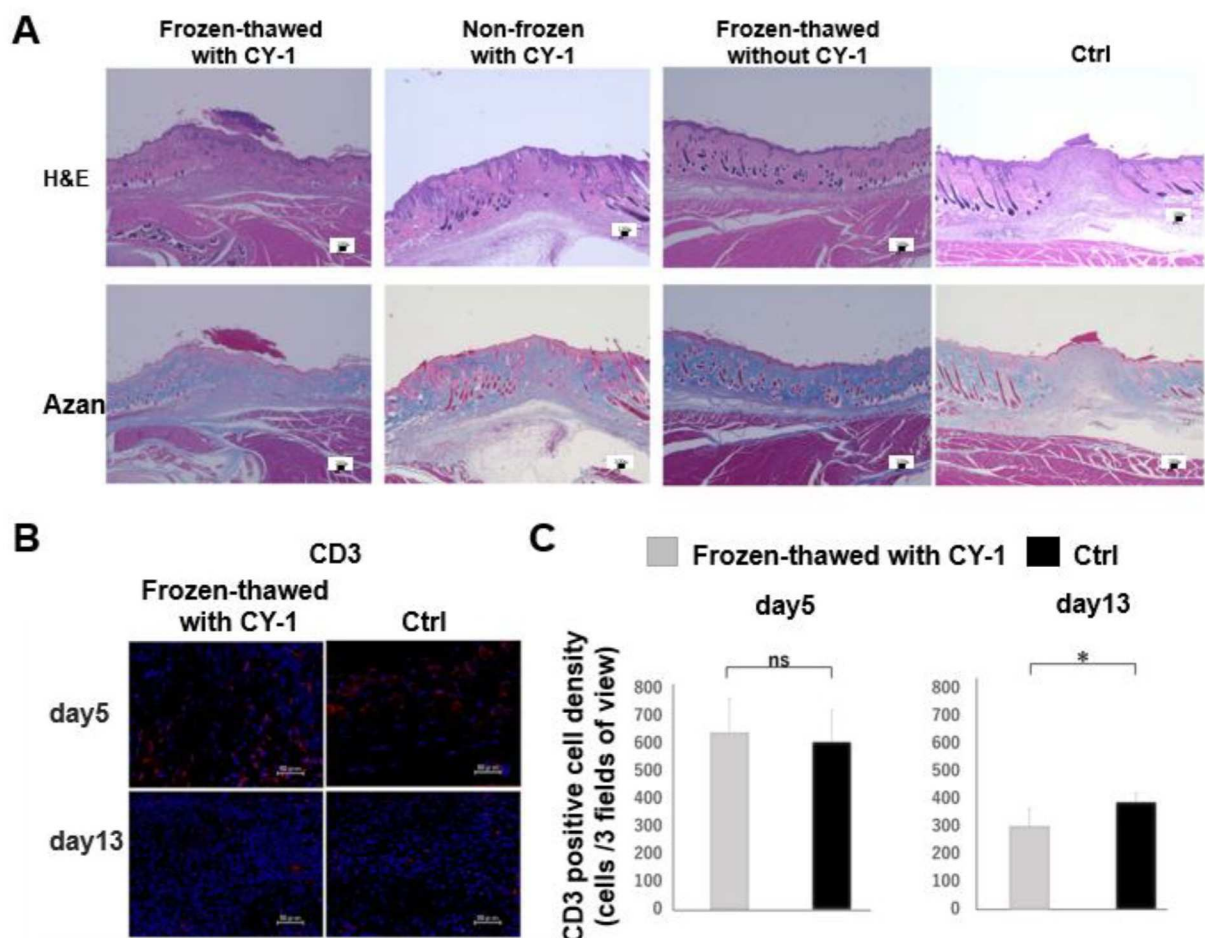


Figure 3. 創傷の病理学的解析および免疫組織化学蛍光染色。

(A) 13 日目の各群における創傷組織の代表的な H&E 染色および Azan 染色画像。拡大画像は創傷中心部を示す (倍率 4×, スケールバー = 100 μ m)。

(B) 創傷組織中の CD3 陽性細胞の評価（5 日目および 13 日目）。

CD3 陽性細胞（CD3: 赤）および核（DAPI: 青）の蛍光染色像（Freeze-thawed with CY-1 群および Ctrl 群, スケールバー = 50 μm ）。

(C) 肉芽組織の 3 視野における CD3 陽性細胞の数（Freeze-thawed with CY-1 群および Ctrl 群, 5 日目および 13 日目, $n = 4$ ）。

移植後の凍結解凍線維芽細胞シートの生存期間

C57BL/6 GFP トランスジェニックマウスの尾部から線維芽細胞を単離し、凍結解凍した GFP 発現線維芽細胞シート（CY-1 培養）を皮膚創傷治癒モデルに移植した。GFP 発現細胞は 1 日目から 14 日目まで観察された。7 日目には、GFP 発現細胞はシート構造を失っていた。14 日目でも GFP 発現細胞は依然として存在していたものの、細胞数は減少していた（Figure 4）。

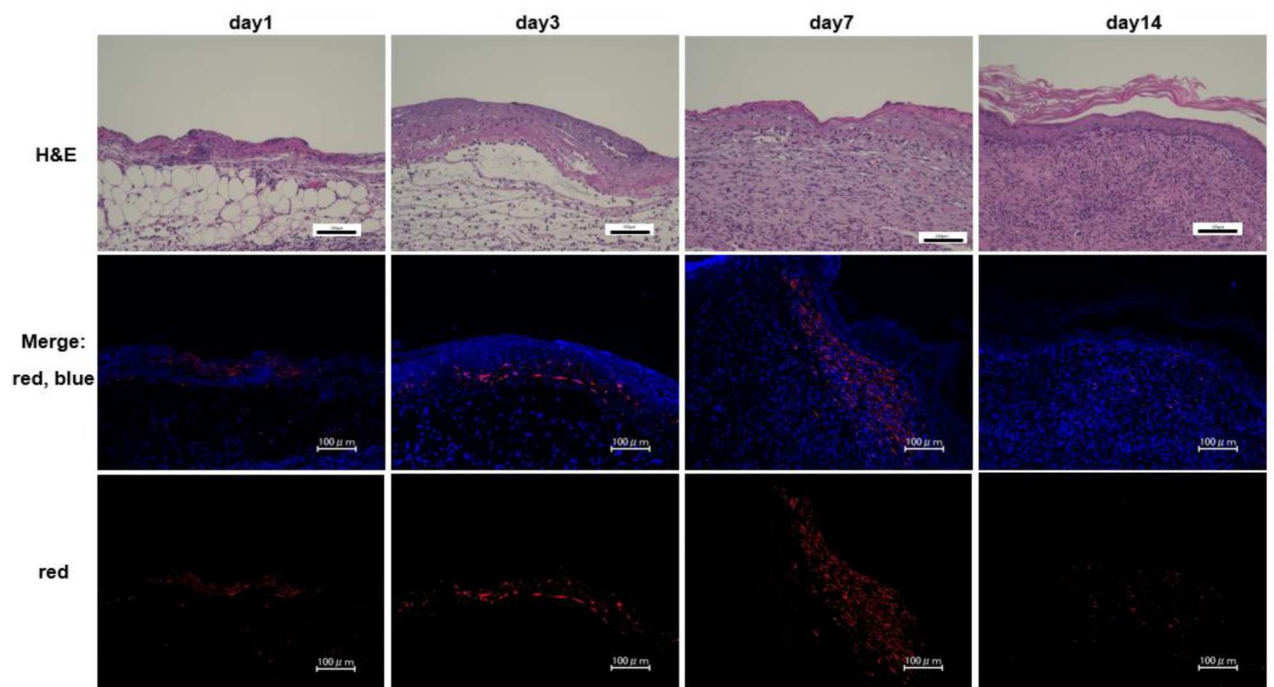


Figure 4. 糖尿病 C57BL/6 マウス皮膚創傷治癒モデルに移植された GFP 発現線維芽細胞シートの解析。

GFP 発現細胞における抗 GFP 抗体染色（GFP: 赤）および核（DAPI: 青）の蛍光染色像。

GFP 発現細胞は 1, 3, 7, 14 日目に観察された（スケールバー = 100 μm）。

凍結解凍ヒト線維芽細胞シート（CY-1 培養）の皮膚創傷治癒動物モデルにおける治療効果

ヒト線維芽細胞に対する CY-1 および凍結保存の影響を解析した。CY-を用いてヒト線維芽細胞を 24 時間培養した細胞を「Non-frozen 24 hr（非凍結 24 時間）」として基準点とし、この時点の細胞生存率を 100%とした。その後、ヒト線維芽細胞は 3D フリーザーを用いて凍結され、 -150°C で 55 日間保存後に解凍され、24 時間培養された「24 hr after thawing（解凍 24 時間）」細胞生存率に関して、「Non-frozen 24 hr」と「24 hr after thawing」間で統計学的に有意な差は認められなかった（Figure 5A）。

VEGF の分泌量については、「Non-frozen 48 hr（非凍結 48 時間）」と「24 hr after thawing」間で有意な差はなかった。一方、HGF の分泌量は「24 hr after thawing」において、「Non-frozen 48 hr」と比較し、有意に増加していた（Figure 5B）。

治療実験は、NOD/SCID マウスを用いた皮膚創傷治癒モデルにおいて、対照群（無処置）と凍結解凍した CY-1 培養ヒト線維芽細胞シート移植群で比較した。ヒト線維芽細胞シートは、 -150°C で 55 日間凍結保存された後、解凍直後に移植された。マウスの背部に皮膚欠損を作製し、撮影を行った。その直後にヒト線維芽細胞シートを皮膚欠損部へ移植し、創傷部の経過観察を 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 日目に実施した（Figure 5C）。

創傷治癒率（%）は、1 日目から 11 日目まで異種移植群（ヒト線維芽細胞シート移植群）で対照群よりも有意に高かった。

特に、以下の各日で有意な創傷治癒促進効果が認められた：

- 1 日目（異種移植 vs. 対照群: -3.49 ± 9.87 vs. -17.65 ± 9.15 [$p = 0.0009$])
- 3 日目 (9.91 ± 10.36 vs. -3.98 ± 11.10 [$p = 0.003$])
- 5 日目 (32.12 ± 11.00 vs. 15.87 ± 12.32 [$p = 0.0016$])
- 7 日目 (53.20 ± 11.34 vs. 39.53 ± 8.60 [$p = 0.002$])
- 9 日目 (68.31 ± 4.32 vs. 61.88 ± 7.25 [$p = 0.027$])
- 11 日目 (82.11 ± 4.33 vs. 77.07 ± 5.09 [$p = 0.028$])

13 日目および 15 日目には、両群間に有意な差は認められなかった（Figure 5D）。

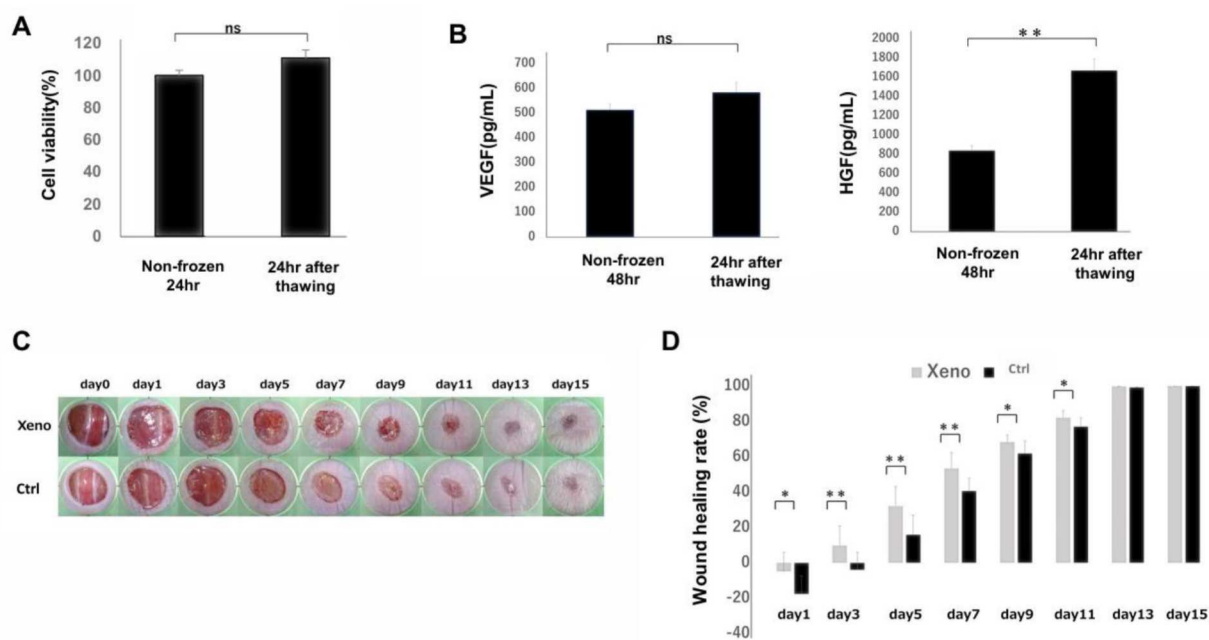


Figure 5. 免疫不全マウスにおける凍結・解凍異種線維芽細胞シートの皮膚創傷治癒に対する治療効果。

(A) ヒト線維芽細胞の細胞生存率（「Non-frozen 24 hr」と「24 hr after thawing」, n = 3）。

(B) ヒト由来線維芽細胞シートの上清中における VEGF および HGF 濃度（「Non-frozen 48 hr」と「24 hr after thawing」, n = 3）。

(C) 創傷の代表的な肉眼写真（0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 日目）。

Xeno: CY-1 を用いた凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート群

Ctrl: コントロール群（各群 n = 10）。

(D) 凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート移植後の創傷治癒率を両群間で統計的に比較（各群 n = 10, 各日）。

ヒト線維芽細胞の生存および病理学的評価

移植細胞の安全性を評価するため、移植 45 日目に NOD/SCID マウスの 9 つの臓器に対して、ヒト HLA クラス I 陽性細胞の存在を免疫染色で解析した。陽性コントロールであるヒト線維芽細胞シートでは HLA クラス I 陽性細胞が確認されたが、NOD/SCID マウスの 9 つの臓器では検出されなかった (Supplementary Figure 2)。また、13 日目には、両群ともに毛包再生が認められなかったが、45 日目には、両群ともに毛包再生が確認された (Figure 6)。長期観察における毛包再生を評価するため、17、21、25、29、34、39 日目における毛包再生の有無を評価した。評価をする NOD/SCID マウスに対して、再度、皮膚創傷治癒評価を実施し、対照群よりも、CY-1 培養ヒト線維芽細胞シート移植群で有意に早期の治療効果があることを確認し、これらの NOD/SCID マウスに対して、毛包再生の長期観察を行なった (Supplementary Figure 3A)。その結果、ヒト線維芽細胞シート群では対照群と比較して、長期的に毛包再生の有意な促進効果が認められた (Supplementary Figure 3B)。

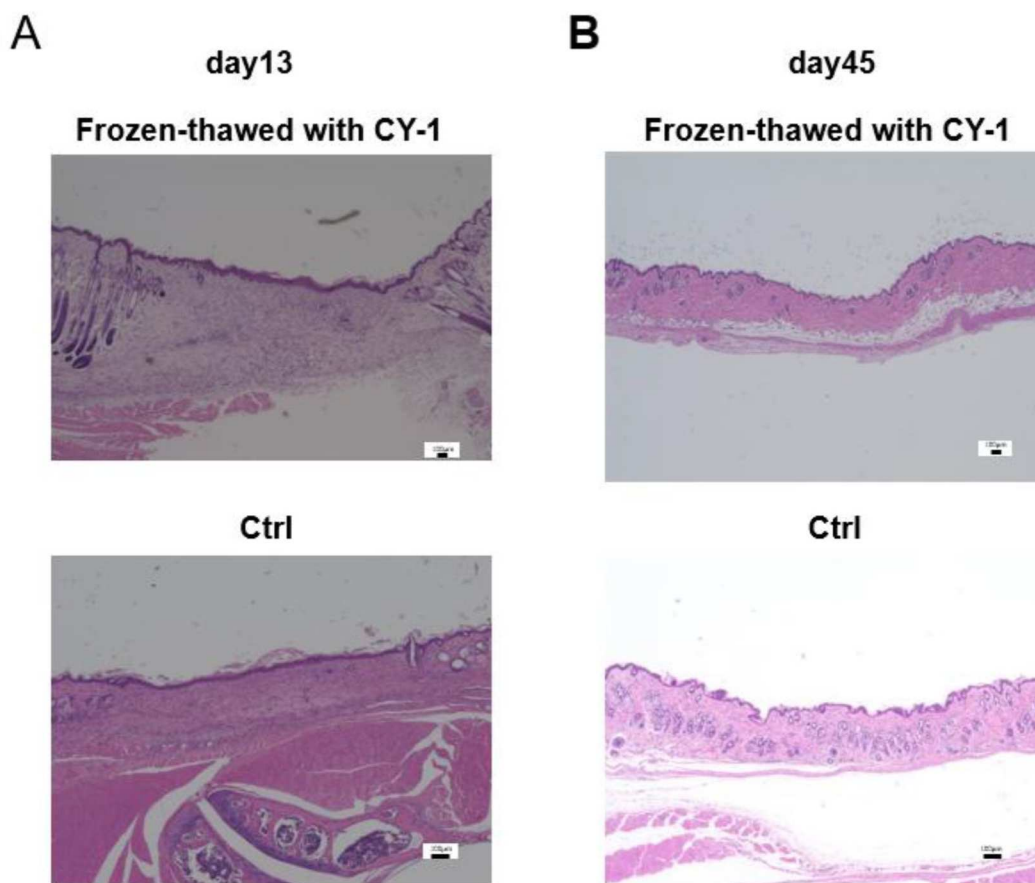
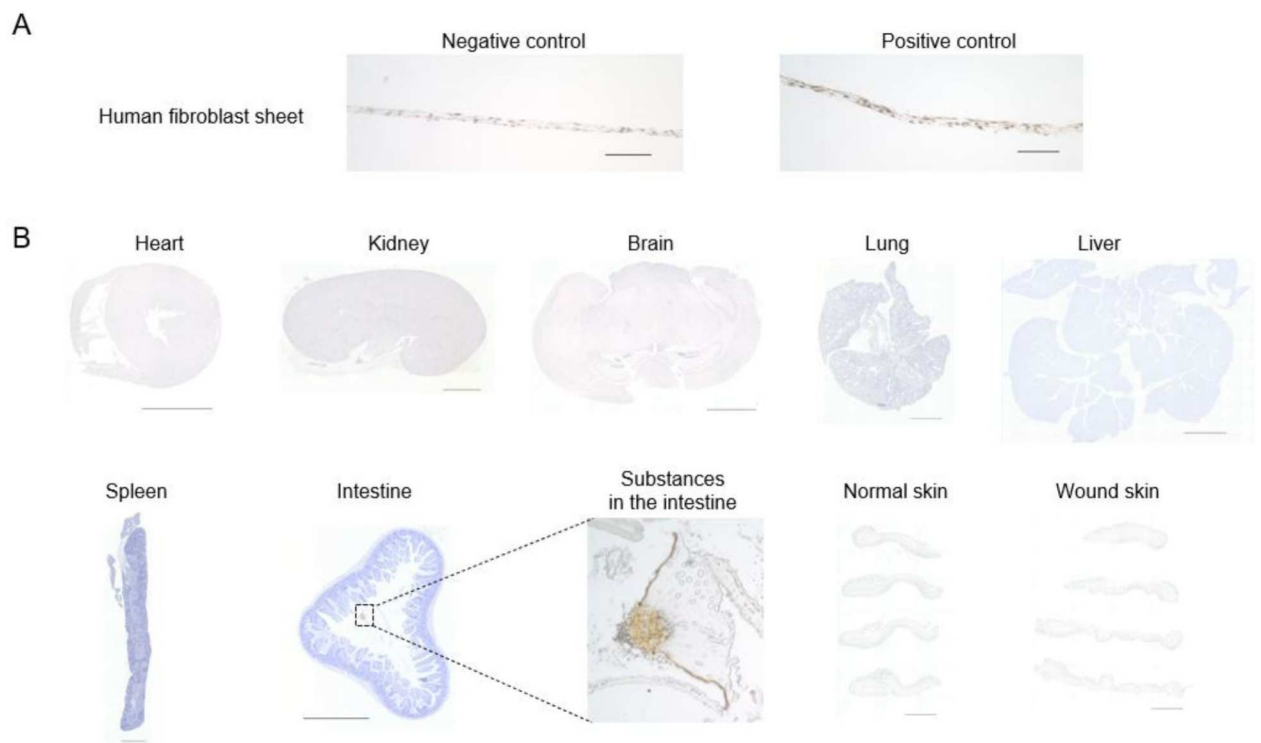


Figure 6. 免疫不全マウスにおける凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート (CY-1) およびコントロール群における毛包再生の確認 (H&E 染色)。

(A) 皮下組織の代表的な組織横断像 (13 日目, スケールバー = 100 μm)。

(B) 皮下組織の代表的な組織横断像 (45 日目)。



Supplementary Figure 2. 免疫不全マウスにおける凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート (CY-1) 移植 45 日後のマウス組織内ヒト細胞の確認。

(A) 抗体の有無による発色確認。

陽性対照：HRP 結合抗 HLA クラス I 抗体と反応後に DAB 染色を実施。

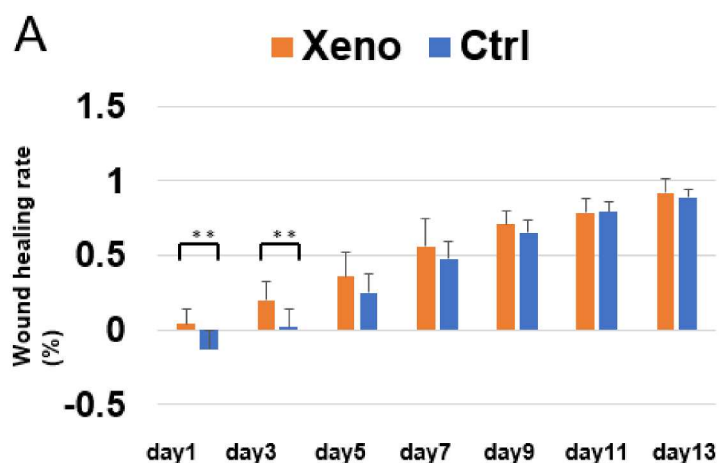
陰性対照：HRP 結合抗 HLA クラス I 抗体と反応させず DAB 染色を実施。

(スケールバー = 100 μm)

(B) 45 日目に HRP 結合抗 HLA クラス I 抗体で免疫染色した 9 つの臓器の代表画像。

創傷皮膚：生検パンチで作製した創部に凍結・解凍ヒト線維芽細胞シートを移植。

スケールバー：脾臓・腸 = 1000 μm 、心臓・腎臓・脳・正常皮膚・創傷皮膚 = 2000 μm 、肺 = 3000 μm 、肝臓 = 5000 μm 。



B

	Xeno	Ctrl
day17	1/3	0/3
day21	2/3	2/3
day25	2/3	0/3
day29	2/3	2/3
day34	0/2	0/3
day39	2/2	0/3

	Xeno	Ctrl	p value
Hair follicle regeneration	9/16	4/18	0.0455

Supplementary Figure 3. 免疫不全マウスにおける凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート (CY-1) 移植後の毛包再生の確認 (H&E 染色, 17~39 日目)。

(A) 凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート移植後の創傷治癒率を統計的に比較 (各群 n = 10)。

毛包再生の確認実験は各群 18 匹で実施。

創傷治癒率の評価は各群 10 匹を対象に 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 日目に実施。

(B) 長期観察における毛包再生の確認。

上段：各観察日における毛包再生が確認されたマウス数。

下段：17~39 日目の Fisher's exact test による群間差の統計解析結果。

Xeno 群で長期飼育中に 2 匹の脱落。

凍結・解凍後線維芽細胞シート移植後の HGF 活性評価

凍結・解凍後のヒト線維芽細胞シートを移植後に、活性型 HGF が観察されるかを確認するため、NOD/SCID マウスの皮膚創傷治癒モデルに対して、抗活性型 HGF 抗体を用いた病理学的解析を実施した。移植 2 日目において、CY-1 で培養した凍結・解凍後ヒト線維芽細胞シート群と対照群で活性型 HGF 陽性細胞数を評価した (Figure 7A)。その結果、異種移植群では対照群と比較して活性型 HGF 陽性細胞数が有意に多かった (異種移植群 vs. 対照群: 600 ± 116 vs. 437 ± 71 , $p < 0.05$) (Figure 7B)。

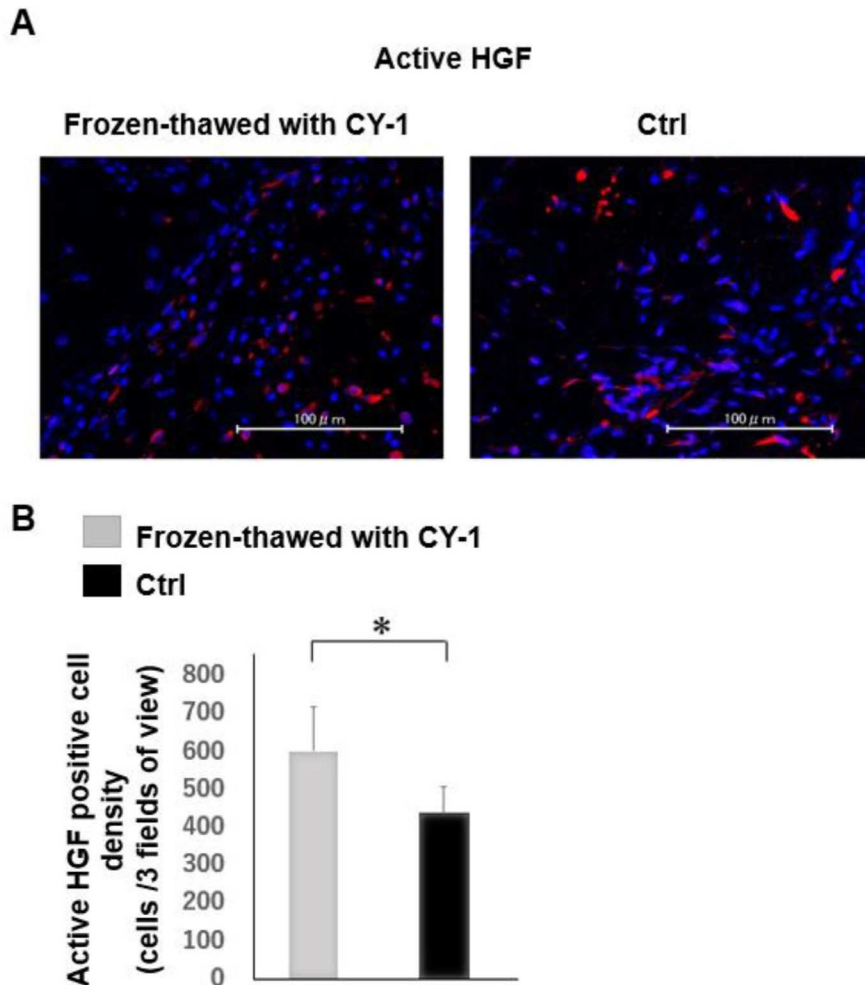


Figure 7. 免疫不全マウスにおける創傷部の免疫組織化学蛍光染色 (2 日目, 凍結・解凍ヒト線維芽細胞シート (CY-1) 群およびコントロール群)。

(A) 創傷組織中の活性型 HGF 陽性細胞の評価 (Active HGF: 赤, 核 (DAPI): 青, スケールバー = 100 μm)。

(B) 肉芽組織の 3 視野における活性型 HGF 陽性細胞数の測定 (各バー, $n = 5$)

考察

我々はこれまでに、自家および同種他家線維芽細胞シートがマウスモデルの皮膚潰瘍に対して創傷治癒効果を持つこと、さらにラットモデルでは脾液漏、気管支断端、および食道の吻合不全に対する組織再生効果を持つことを報告してきた^{8,10,12-14}。

実臨床において線維芽細胞シートでの治療を行うことを考えた時に、2つの課題がある。1つ目は、線維芽細胞シートの高い治療効果を維持しつつ保存する方法の確立、2つ目は、細胞シートの移植を簡便に行うための方法を確立することである。保存に関する課題について、我々は3Dフリーザーで凍結したマウス線維芽細胞シートが、凍結保存および解凍後も治療効果を維持することをマウスモデルで報告した¹⁰。また、細胞シート移植の簡便化に関しては、CY-1上で培養・凍結保存した線維芽細胞シートの移植のしやすさを示した。本研究では、CY-1上で培養した凍結解凍同種他家線維芽細胞シートを移植することで、創傷治癒が著しく促進されることが明らかとなった (Figure 2A、2B)。

マウス線維芽細胞シートは48ウェルプレートにセットしたCY-1上で培養され、移植後、CY-1のみを回収した。生ハムに移植した標本を提示する (Supplementary Figure 4A)。また、マウス線維芽細胞シートはCY-1上で培養され、3Dフリーザーで凍結した後、-150°Cで凍結保存され、解凍直後に生ハムに移植され、同様にCY-1のみが回収された (Supplementary Figure 4B)。CY-1上で培養されたマウス線維芽細胞シートは凍結の有無によって病理学的な差を認めなかった。単離したマウスおよびヒト線維芽細胞において、ビメンチンの発現が確認された (Supplementary Figure 1)。これらの結果は、ラット線維芽細胞の研究報告と一致するものである^{13,14}。

細胞の凍結解凍操作による影響を評価するためには、解凍後24時間の細胞生存率を測定することが重要である¹⁵。本研究では、CY-1の有無にかかわらず、マウス線維芽細胞の解凍後24時間の細胞生存率は50%であり (Figure 1A)、これはFDA基準の70%を下回る数値であった¹⁶。一方、ヒト線維芽細胞の生存率は解凍後24時間で100%であった (Figure 5A)。本研究で用いたマウス線維芽細胞の凍結保存および解凍条件は、臨床応用を想定したヒト線維芽細胞シート移植と同一条件にした。マウス線維芽細胞シートの解凍後の生存率向上を目的とした実験は本研究の範囲外であったため実施していない。マウスとヒトの線維芽細胞の生存率の違いの原因は不明であるが、種の生物学的差異が影響している可能性がある。しかし、本研究ではこの差異についての検討は行わなかった。それにもかかわらず、3つの同種他家線維芽細胞シート移植群はいずれも対照群と比較して顕著な創傷治癒促進効果を示した (Figure 2A、2B)。

CY-1上で培養した凍結解凍線維芽細胞シートの治療効果は、CY-1なしで培養した凍結解凍シートおよびCY-1上で培養した非凍結シートと同等であった (Figure 2A、2B)。したがって、CY-1および凍結解凍操作がこの治療に悪影響を及ぼすことはないと考えられた。解凍直後の細胞生存率は約20%であったものの (Figure 1A)、凍結解凍と非凍結の線維芽細胞シート間で治療効果に差は見られなかった (Figure 2A、2B)。解凍後24時間で生存率が約50%であったことを考慮すると (Figure 1A)、移植後に生存率が回復した可能性が示唆された。

我々は、細胞シート移植による治療効果は、シートから分泌される成長因子による

パラクリン効果によってもたらされると考えている^{4-8,10-15}。線維芽細胞シートの凍結解凍後、VEGF の分泌量は減少傾向を示したが、HGF の分泌量には有意な変化がなかった (Figure 1B、1C)。したがって、CY-1 上で培養した凍結解凍線維芽細胞シートから分泌される成長因子は、十分な創傷治癒効果をもたらす可能性があると考えられた。

正常な皮膚組織は、表皮、真皮、皮下組織が連続しており、組織の境界が不明瞭である。しかし、創傷治癒中の組織では、表皮と真皮の連続性が失われる (Figure 3A)。創傷治癒初期の組織には毛包が存在せず、炎症細胞の浸潤が見られる。対照群の組織病理学的解析では、創傷治癒組織の中央部には毛包が観察されなかった。そのため、正常な皮膚組織と創傷治癒組織の境界が明瞭であった。3 つの同種他家線維芽細胞シート群では、病理組織の中央部の毛包密度は周縁部と比較して低かった。また、3 つの同種他家線維芽細胞シート群では、病理組織の中央部に炎症細胞の浸潤が確認された。一方で、凍結解凍した CY-1 上で培養した同種他家線維芽細胞シートでは、13 日目において CD3 陽性細胞の減少が有意に認められた (Figure 3B、3C)。これは、線維芽細胞シートが創傷治癒の進行を促進し、不必要な CD3 陽性細胞が治癒組織から排除されたためと考えられる。HGF は、間葉系細胞における内因性修復因子として報告されており、組織損傷後の再生および修復に寄与することが知られている¹⁷⁻¹⁹。間葉系幹細胞から分泌される TGF- β 1、IL-10、および HGF のような免疫抑制因子が、拒絶反応を軽減すると考えられている²⁰⁻²²。我々のデータは、線維芽細胞シートから分泌される HGF が、過剰な免疫応答を抑制しながら組織再生を促進することを示唆している。

GFP を発現する線維芽細胞シートを凍結解凍後、CY-1 上で培養し移植したところ、シート構造は移植後 7 日目まで観察された (Figure 4)。14 日目には GFP 陽性細胞は確認されたが、シート構造は維持されておらず、これは線維芽細胞シートが移植後 7～15 日で消失するというこれまでのデータと一致していた^{8,10,13,14}。培養中の線維芽細胞シートが HGF を分泌することは証明されているが、移植後も分泌が続くかは明らかではなかった。HGF は前駆体 HGF として細胞から分泌されるが、この前駆体 HGF 自体には生理活性がなく、プロテアーゼによる切断を受けて生理活性を持つ成熟型 HGF (活性型 HGF) に変換される²³。そのため、線維芽細胞シート移植後の活性型 HGF を評価したところ、NOD/SCID マウスの潰瘍部において、ヒト線維芽細胞シート移植群で有意に活性型 HGF が検出された (Figure 7)。これらの結果は、HGF が細胞シート移植による創傷治癒において主要な役割を果たす可能性を示唆している。

-150°C で 55 日間凍結保存された CY-1 上で培養したヒト線維芽細胞シートは、解凍後 24 時間の細胞代謝および VEGF 濃度が、非凍結のヒト線維芽細胞シートと同程度であった (Figure 5A、5B)。したがって、ヒト線維芽細胞は-150°C で 55 日間凍結された後も、細胞代謝および成長因子の分泌能を維持しており、CY-1 は細胞代謝および VEGF 分泌に影響を与えないことが示された。さらに、CY-1 上で培養されたヒト線維芽細胞の HGF 分泌は、凍結解凍後に増加していた。-150°C で 55 日間凍結されたヒト線維芽細胞シートを解凍直後に移植した場合、対照群と比較して創傷面積の治癒率が有意に向上した (Figure 5C、5D)。凍結・解凍によるストレス応答が HGF 分泌を促進する可能性がある。そのため、ヒト線維芽細胞の細胞代謝は NOD/SCID マウスの

移植部位で回復し、成長因子が創傷治癒に治療効果をもたらす可能性がある。

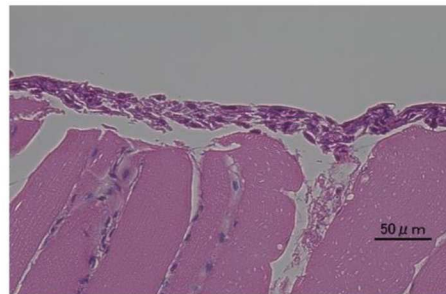
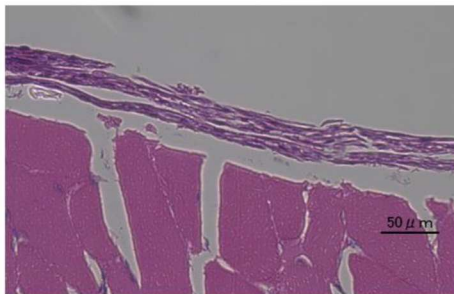
また、線維芽細胞シートはコラーゲン沈着を誘導することで治癒を促進することが示されている¹⁴。Azan 染色の結果、対照群では潰瘍部の膠原線維の再生が不十分であったのに対し、細胞シート移植群では正常組織と同程度の膠原線維の再生が確認された (Figure 3A)。これは、細胞シートを移植した組織でコラーゲン沈着が促進されたことを示唆している。

さらに、ヒト線維芽細胞シートを移植した NOD/SCID マウスでは、移植後 45 日目に HLA クラス I 陽性細胞は検出されなかった。そのため、ヒト線維芽細胞の腫瘍形成能は非常に低いと考えられた (Supplementary Figure 2)。ヒト線維芽細胞シート群では、17 日目、21 日目、25 日目、29 日目、34 日目、39 日目に毛包再生が観察され、長期観察において対照群と比較して毛包再生が有意に促進されていた (Supplementary Figure 3B)。この結果は、凍結解凍したヒト線維芽細胞シートが組織再生のための創傷治癒を促進することを示唆している。

本研究のデータは、凍結解凍直後に移植した線維芽細胞シートが、糖尿病モデルの C57BL/6 マウスおよび NOD/SCID マウスの皮膚創傷治癒モデルにおいて、創傷治癒を促進することを示している。したがって、臨床に応用する場合においても、凍結解凍直後の線維芽細胞シートを患者に移植することが可能であると考えられる。

A

B



Supplementary Figure 4. CY-1 上で培養した線維芽細胞シートの生ハム移植後の病理組織写真。

(A) 非凍結マウス線維芽細胞シートの生ハム移植。

(B) 凍結・解凍マウス線維芽細胞シートの生ハム移植。

結論

凍結解凍した CY-1 上で培養された積層線維芽細胞シートは、非凍結の積層線維芽細胞シートと同等の治療効果をマウスモデルで示した。凍結保存と CY-1 の組み合わせにより、線維芽細胞シートの移植の利便性を向上させ、線維芽細胞シート療法の臨床応用を促進できる可能性がある。

限界 (Limitations)

本研究の最終的な目的は、CY-1 を用いたヒト線維芽細胞シートの創傷治癒効果を明らかにすることであった。しかし、本研究ではヒトにおける治療効果を直接解明するには至っていない。活性型 HGF が線維芽細胞による創傷治癒に関与していると考えられるが、その基礎的なメカニズムは未解明である。

用語

- **ELISA:** 酵素結合免疫吸着アッセイ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- **GFP:** 緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein)
- **H&E:** ヘマトキシリン・エオジン染色 (Hematoxylin and eosin)
- **HGF:** 肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor)
- **VEGF:** 血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor)

謝辞

技術的支援をいただいた弘中紫様に感謝申し上げます。

References

1. Järbrink K, Ni G, Sönnnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 2016;5:152. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0329-y>.
2. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen* 2009;17:763–71. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>.
3. Nunan R, Harding KG, Martin P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech* 2014;7:1205–13. <https://doi.org/10.1242/dmm.016782>.
4. Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, et al. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep* 2016;6:28538. <https://doi.org/10.1038/srep28538>.
5. Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Oga A, 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* 2017;9:2340–51.
6. Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T, et al. Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:201–11. <https://doi.org/10.1159/000489767>.
7. Mizoguchi T, Suehiro K, Ueno K, Ike S, Nagase T, Samura M, 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* 2021;13:9495–504.
8. Nagase T, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Suehiro K, et al. Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice. *Am J Transl Res* 2020;12:2652–63.
9. Ueno K, Ike S, Yamamoto N, Matsuno Y, Kurazumi H, Suzuki R, et al. Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing. *Biochem Biophys Rep* 2021;28:101169. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101169>.
10. Ike S, Ueno K, Yanagihara M, Mizoguchi T, Harada T, Suehiro K, et al. Cryopreserved allogenic fibroblast sheets: development of a promising treatment for refractory skin ulcers. *Am J Transl Res* 2022;14:3879–92.
11. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *F.E.B.S. Lett* 1997;407:313–9. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00313-X).
12. Iwamoto K, Saito T, Takemoto Y, Ueno K, Yanagihara M, Furuya-Kondo T, et al. Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis. *Am J Transl Res* 2021;13:1257–68.
13. Yoshimine S, Ueno K, Murakami J, Saito T, Suzuki R, Asai Y, et al. Autologous multilayered fibroblast sheets can reinforce bronchial stump in a rat model. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2022;34:349–58. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2021.03.010>.

14. Yamamoto N, Ueno K, Yanagihara M, Kurazumi H, Tanaka Y, Oga A, et al. Allogenic multilayered fibroblast sheets promote anastomotic site healing in a rat model of esophageal reconstruction. *Am J Transl Res* 2023;15:3217–28.
15. Hayashi Y, Horiguchi I, Kino-Oka M, Sugiyama H. Model-based assessment of temperature profiles in slow freezing for human induced pluripotent stem cells. *Comput Chem Eng* 2021;144:107150. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2020.107150>.
16. US Food and Drug Administration. Guidance for FDA reviewers and sponsors: content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for somatic cell therapy investigational new drug applications (INDs); 2008.
17. Yamada T, Hisanaga M, Nakajima Y, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T, et al. Enhanced expression of hepatocyte growth factor by pulmonary ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:707–15. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.2.9908064>.
18. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from infarction by endogenous and exogenous hepatocyte growth factor. *J Clin Invest* 2000;106:1511–9. <https://doi.org/10.1172/JCI10226>.
19. Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000;57:937–48. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.4491416>.
20. Kot M, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Musiał-Wysocka A, Suda-Szczurek M, Majka M. The importance of HLA assessment in “off-the-shelf” allogeneic mesenchymal stem cells based-therapies. *Int J Mol Sci* 2019;20:5680. <https://doi.org/10.3390/ijms20225680>.
21. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838–43. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838>.
22. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1193>.
23. Umitsu M, Sakai K, Ogasawara S, Kaneko M, Asaki R, et al. Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. *Sci Rep*. 2016;9:6:33149. <https://doi.org/10.1038/srep33149>.