

奨励金No.1557

組織修復・再生療法での普及を目指したヒト乾燥積層線維芽細胞シートの開発

柳原 正志

大阪大学大学院医学系研究科 保健学専攻 生体病態情報科学講座 特任助教（常勤）

Development of human dry-preserved multilayered fibroblast cell sheets for tissue repair and regenerative therapy

Masashi Yanagihara,

Department of Clinical Laboratory and Biomedical Sciences, Osaka University Graduate School of Medicine, Specially Appointed Assistant Professor



本研究では、ヒト乾燥細胞シートの作製に最適な細胞を明らかにした。ヒトの細胞シートとして既に報告のある7種類の細胞のうち、線維芽細胞、歯髄幹細胞、間葉系幹細胞などの間葉系細胞にFGF2が多く含まれていた。これらの細胞から作製した乾燥細胞シートを用いて、成長因子の放出量や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。線維芽細胞は細胞の入手性、増殖能、培養コストなどにも優れるため、ヒト乾燥細胞シートに最適な細胞源である。

In this study, we identified the most suitable cell types for human dry-preserved cell sheets. Of the seven cell types previously reported as human cell sheets, mesenchymal cells such as fibroblasts, dental pulp stem cells and mesenchymal stem cells contained high levels of FGF2. Dry-preserved cell sheets prepared from these cells were examined for the release of growth factors and biological activity, and fibroblasts were the most superior cells in this study. Fibroblasts are ideal for the clinical application of dry-preserved cell sheets in humans owing to their high intracellular FGF2 content, fast cell proliferation, ease of handling, availability, and low culture costs.

1. 研究内容

1.1 背景

細胞シート移植治療の普及には、簡便に使用できる細胞シートの保存方法の開発が不可欠である。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、生きた細胞を保存する凍結保存が主に検討されてきた。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た。風乾させた積層線維芽細胞シート

（乾燥細胞シート）のマウスでの基礎検討から、乾燥細胞シートはシート形状を保持したまま鉗子で把持でき、従来の生きた細胞シートに比べて移植の際の操作性に優れていること、他家細胞で作製した乾燥細胞シートは創傷治癒促進効果を有することが明らかになり、細胞シートの乾燥保存の可能性が示された。また、その作用機序の検討から、乾燥細胞シートは細胞膜が損傷した死細胞であったが、再水和すると細胞内の生理活性物質（各種成長因子）を放出することを見出した。細胞シートから分泌される血管新生因子のVEGF (vascular endothelial growth factor) や HGF (hepatocyte

growth factor)に加え、生きた細胞シートからは分泌されない細胞内の FGF2 (fibroblast growth factor 2; basic FGF) を高レベルに放出した。乾燥細胞シートが放出する生理活性物質は、線維芽細胞の細胞増殖と HGF の産生を有意に促進する生物活性を有し、主に FGF2 による作用であった (Scientific Reports, 2022; 12: 12519.)。

FGF2 は強力な細胞増殖因子で、創傷治癒の促進と血管新生に重要な成長因子として知られているものの、分泌シグナル配列を持たず、細胞外への分泌効率が悪いいため、細胞シート移植治療での FGF2 の働きはこれまで知られていなかった。従来の生細胞シートは移植細胞からの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、乾燥細胞シートでは細胞内の FGF2 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 FGF2 レベルを比較した研究は少なく、ヒトではどの細胞が乾燥細胞シートに適しているのか不明である。本研究では、ヒトへの臨床応用に向け、乾燥細胞シートに適したヒトの細胞種を明らかにすることを目的に、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種類のヒト細胞について細胞内 FGF2 レベル及びその生物活性を検討した。

1.2 ヒト細胞の細胞内 FGF2 含有量の検討

細胞シートとして報告のあるヒト口腔組織由来線維芽細胞 (HOFs)、ヒト皮膚由来線維芽細胞

(HDFs)、ヒト歯髄幹細胞 (DPSCs)、間葉系幹細胞 (MSCs)、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs)、ヒト骨格筋芽細胞 (SkMMs)、ヒト表皮角化細胞 (HEKs) の7種類の細胞について、凍結融解により細胞内容物を抽出し、総タンパク質 1 μg あたりの FGF2 量を比較した。FGF2 は、線維芽細胞や DPSCs、MSCs を含む間葉系細胞で高かったのに対し、HUVECs、SkMMs、HEKs 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 (図 1A)。HGF および VEGF 量も比較したところ、HGF は MSCs で最も高く、HOFs がそれに続き、他の細胞抽出物では低かった (図 1B)。VEGF は MSCs では高かったが、他の細胞抽出物では低かった (図 1C)。間葉系細胞での3つの成長因子のタンパク質 1 μg あたりの量は、FGF2 では約 40 $\text{pg}/\mu\text{g}$ のレベルであったのに対し、HGF では 4 $\text{pg}/\mu\text{g}$ 、VEGF はさらに低く、約 1 $\text{pg}/\mu\text{g}$ 以下のレベルであった。

1.3 ヒト乾燥細胞シートから放出される成長因子量の検討

HOFs、DPSCs および MSCs からヒト乾燥細胞シートを作製し、各シートを溶液 (DMEM 培地) に浸漬して生理活性物質を放出させ、溶出液を調製した。溶液中に放出された総タンパク質 1 μg あたりの FGF2、VEGF および HGF の量を測定した。HOFs の FGF2 レベルが最も高く、凍結融解によって得られた細胞抽出物中の FGF2 量の 72.8%

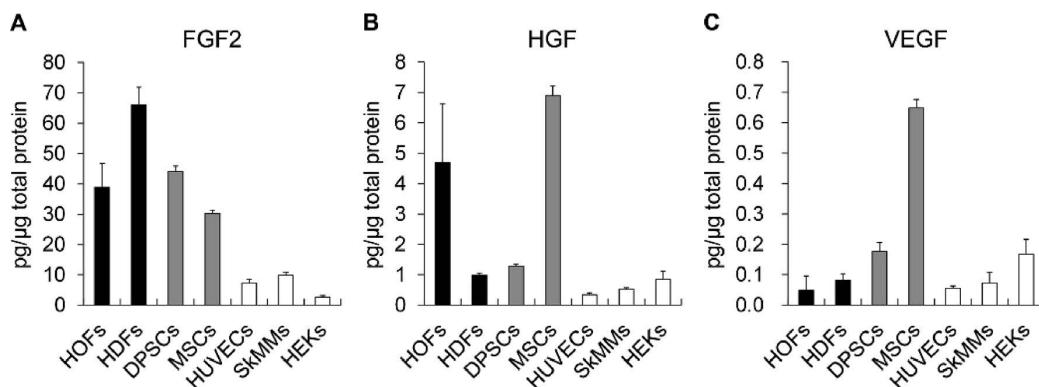


図1 細胞シートに用いられる各種ヒト細胞の凍結融解抽出液中の成長因子の比較。(発表論文1より引用)

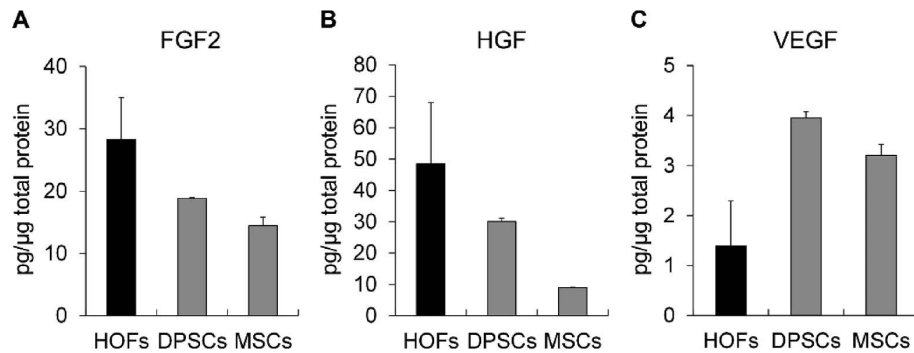


図2 ヒト乾燥細胞シートから放出される成長因子の比較。（発表論文1より引用）

であり、次にDPSCsとMSCsが続き、それぞれ凍結融解によって得られた細胞抽出物中のFGF2量の42.9%と47.9%であった（図2A）。さらに、HOFsおよびDPSCsは48.5 pg/μgおよび30.1 pg/μgと高いHGF量を示し、これは細胞抽出物中のHGF量よりもそれぞれ10.3倍および23.3倍高く（図2B）、MSCsのHGF量は8.95 pg/μgであり、細胞抽出物よりも1.30倍高かった。VEGF量はDPSCsで最も高く、次にMSCs、HOFsが続き、細胞抽出物よりも高い値を示した（図2C）。

1.4 ヒト乾燥細胞シートから放出される成長因子の生物活性の検討

ヒト乾燥細胞シートが放出する成長因子の生物活性を明らかにするため、*in vitro*でHUVECsを用いた細胞増殖試験を行った。ECGM培地とDMEM培地で5倍希釈した溶出液を1:1の比率で混合し、HUVECsを48時間培養した。図3に示すように、HOFs、DPSCsおよびMSCsの乾燥細胞シート溶出液を添加した群ではコントロール（DMEM培地）に比べ、有意な細胞増殖の促進がみられた。さらに、HOFsの乾燥細胞シート溶出液を添加した群では、DPSCsおよびMSCsの乾燥細胞シート溶出液を添加した群に比べ、有意な細胞増殖の促進を示した。以上の結果から、ヒト乾燥細胞シートが放出する成長因子は細胞に対する生物活性を有することが明らかになった。

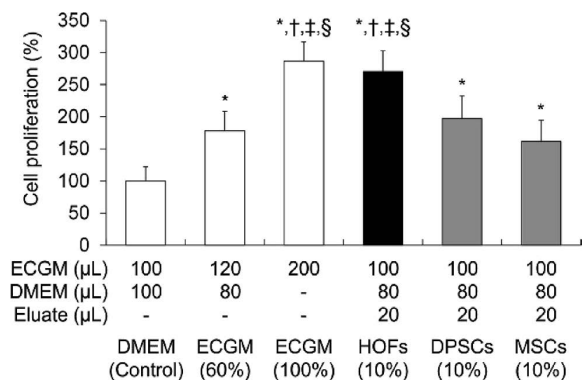


図3 HOF、DPSCおよびMSCから作製したヒト乾燥細胞シート溶出液に対するHUVECsの細胞増殖の比較。（発表論文1より引用）

1.5 FGF2中和抗体を用いたヒト乾燥細胞シートの生物活性に対する抑制効果の検討

FGF2は強力な増殖因子であり、乾燥細胞シート溶出液には大量のFGF2が含まれており、FGF2が乾燥細胞シート溶出液の生物学的活性への寄与が考えられる。そこで、FGF2中和抗体とFGF2組換えタンパク質（rFGF2）を用いて、溶出液中のFGF2がHUVECsの細胞増殖に直接影響するのかどうかを調べた。ヒト乾燥細胞シート（HOFs）溶出液またはrFGF2をコントロール抗体で処理した群ではHUVECsの細胞増殖が促進されたのに対し、FGF2中和抗体で処理した群では有意に抑制された（図4）。以上の結果から、ヒト乾燥細胞シートの生物活性は主にFGF2による作用であることが示された。

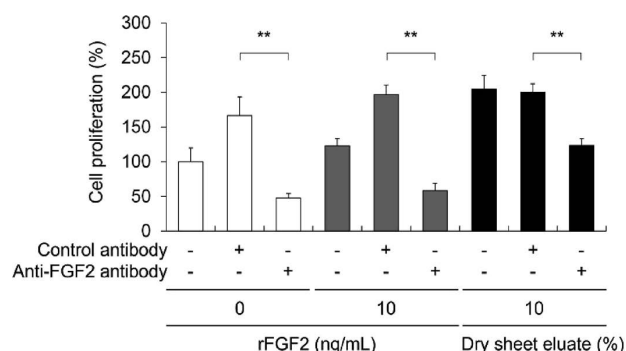


図4 FGF2中和抗体で処理したヒト乾燥細胞シート（HOFs）溶出液に対するHUVECsの細胞増殖への影響。（発表論文1より引用）

1.6 考察

本研究では、乾燥細胞シートの臨床応用に最適な細胞を特定するため、細胞内FGF2レベルを指標として、様々な細胞を比較したところ、線維芽細胞を含む間葉系細胞で細胞内FGF2量が多いことが明らかになった。さらに、間葉系細胞（HOFs、DPSCsおよびMSCs）で作製したヒト乾燥細胞シートは再水和するとFGF2、HGFおよびVEGFを放出することが明らかになった。特に、HOFsで作製した乾燥細胞シートは、放出されるFGF2とHGFの値が最も高く、また、DPSCsやMSCsに比べてHUVECsの増殖も有意に促進し、最も強い生物活性を示した。臨床応用の観点から乾燥細胞シートに最適な細胞を考えた場合、細胞内FGF2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、ヒト乾燥細胞シートの臨床応用に理想的な細胞源である。今回、ヒト乾燥細胞シートにおいて、FGF2の放出とその生物活性が確認できた。これまでのマウスでの基礎検討で得られた知見と同様に、ヒト乾燥細胞シートから放出されるFGF2は創周囲の細胞に作用し、創傷治癒を促進することが推察される。乾燥細胞シートは操作性と保存性の点で従来の細胞シートよりも優れるため、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。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なり、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真の「細胞絆創膏」になり得る。

2. 発表（研究成果の発表）

2.1 論文発表

- (1) 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*, 35: 101510, 2023.
- (2) 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. *American Journal of Translational Research*, 15: 3217-3228, 2023.

2.2 学会発表

- (1) 柳原正志、松野祐太郎、上野耕司、齋藤寿郎、蔵澄宏、鈴木亮、桂春作、小賀厚徳、濱野公一、組織修復・再生療法での普及を目指した乾燥積層線維芽細胞シートの開発、第22回日本再生医療学会総会（京都、2023年3月24日）