

～急性腎不全の犬への間葉系幹細胞投与の効果～

Mesenchymal Stem Cells Contribute to Improvement of Renal Function in a Canine Kidney Injury Model

SEUNG-JUN LEE et al. (2017) *In Vivo* November-December 2017 vol. 31 no. 6

«Intro»

- ・急性腎障害（AKI）は突然の腎機能喪失によって起こる疾患である。
- ・臨床症状として、嘔吐や食欲不振、体重減少、運動不耐性を示し、最終的に死に至る疾患である。
- ・本研究では、AKIの犬に対する犬臍帯血幹細胞（cUCB-MSCs）の治療効果を検討する。

«cUCB-MSCs»

- ・犬の臍帯血から単核球を分離し、T75 フラスコ、low-glucose DEME で培養。
- ・cUCB-MSCs を緑色蛍光たんぱく質（GFP）でラベリングされた。
- ・分化能解析：骨分化能⇒分化誘導培地で培養後、アリザリンレッド S で染色（石灰沈着を染色）
脂肪分化能⇒分化誘導培地で培養後、オイルレッド O で染色
軟骨分化能⇒分化誘導培地で培養後、パラフィン包埋されてトルイジンブルーで染色

«study design»

- ・14 頭の♂ビーグル犬がエンロール（年齢：6 か月齢～1 歳、体重：10-15kg）。
- ・血液検査で腎機能が正常なことを確認。
- ・3 つのグループに分けて実験
- ・グループ 1：AKI + cUCB-MSCs（n=3）
- ・グループ 2：AKI + PBS（n=8）
- ・グループ 3：non-AKI（n=3）

«AKI モデル»

- ・ゲンタマイシン（15mg/kg）：2 週間にわたり 1 日に 3 回静脈投与。
- ・シスプラチン（70mg/m²）：ゲンタマイシン投与最終日に一回量を静脈投与。
- ・上記の方法で AKI を誘発。

«cUCB-MSCs の投与»

- ・麻酔下、超音波下で 1.5 インチ 23 ゲージ針で cUCB-MSCs（1×10⁶個/30μl PBS）を両側の腎臓皮質に 2 回（day6,23）直接投与（n=3）。
- ・同様に day6,23 に PBS を 30μl 投与（n=8）。
- ・non-AKI は無処置。

- ・7 週間後に全ての動物を安楽死させ、腎臓を回収し、分析した。

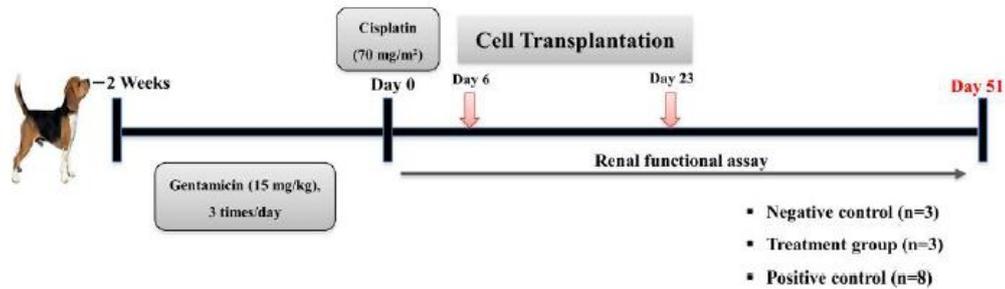


Figure 1. Schematic overview of the experiment. The canine acute kidney injury model was induced by administration of gentamicin and cisplatin for two weeks. Transplantation with mesenchymal stem cells derived from canine umbilical blood was performed two times on day 6 and day 23. All animals were euthanized on day 51.

「腎機能評価」

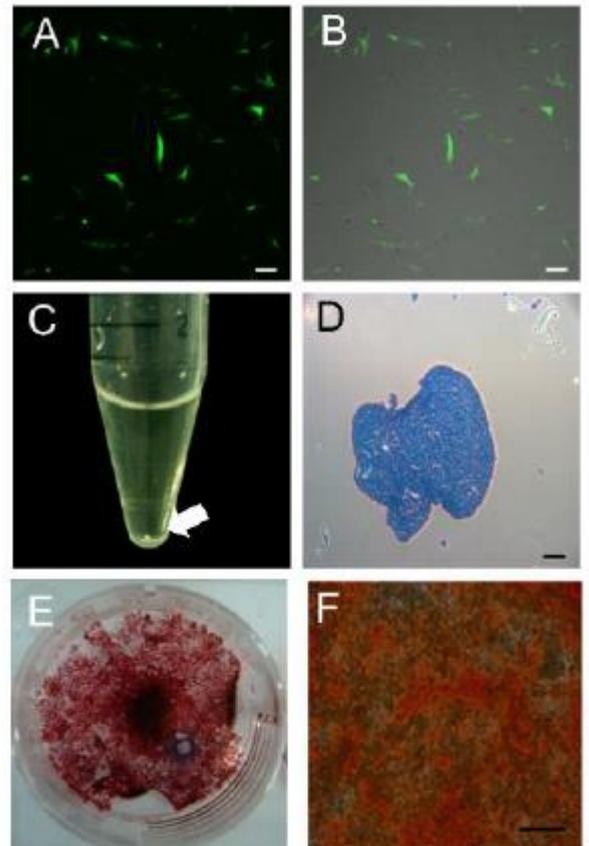
- ・BUN とクレアチンを基に腎機能の評価。（基準値：BUN 8-30mg/dl、クレアチン 0.5-1.5mg/dl）
- ・血液サンプルは週に 2,3 回収集された。

「移植した cUCB-MSCs の検出」

- ・移植した cUCB-MSCs は投与から 51 日後に剖検され、検出された。
- ・GFP でラベリングされた cUCB-MSCs を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。

「結果」

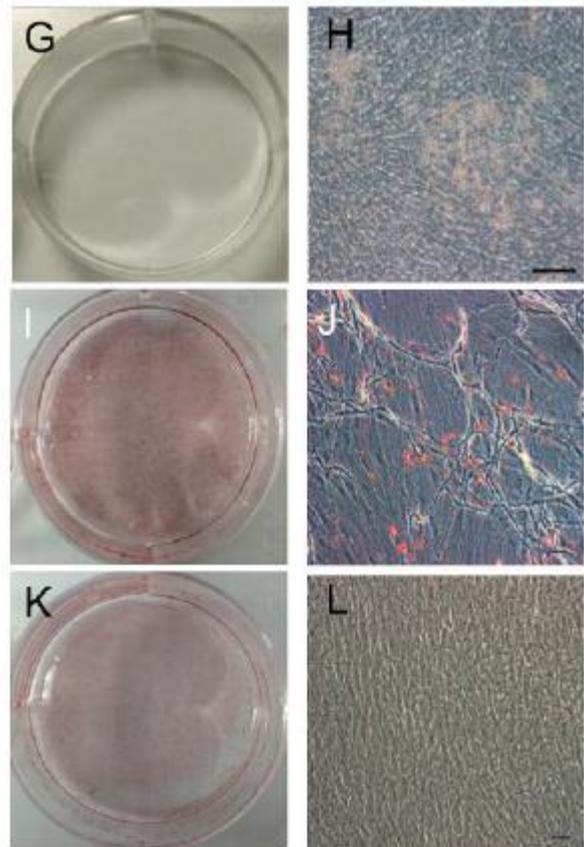
- ・A,B：GFP でラベリングされた cUCB-MSCs
ラベリングが確認された cUCB-MSCs を投与した
- ・C：軟骨分化誘導後に収集されたペレット（卵形、不透明）
- ・D：トルイジンブルー陽性（軟骨分化能）
- ・E,F：骨分化誘導⇒アリザリンレッド S 陽性



- G,H : 軟骨分化誘導なし⇒アリザリンレッド S 陰性
- I,J : 脂肪分化誘導⇒オイルレッド O 陽性
- K,L : 脂肪分化誘導なし⇒オイルレッド O 陰性

《AKI モデル》

- 嘔吐、食欲不振、体重減少といった臨床症状を示した。
- BUN およびクレアチニンの上昇を示した。
- non-AKI モデルは健康的で BUN,クレアチニンの上昇はみられなかった



《生存率》

- 試験終了時 (day51)
- cUCB-MSCs⇒全員生存 (n=3)
- PBS⇒1 頭のみ生存 (n=8) 、
day15,33,41 に 2 頭ずつ、day47 に
1 頭死亡
- 生存率は cUCB-MSCs の方が高い
(p=0.007)

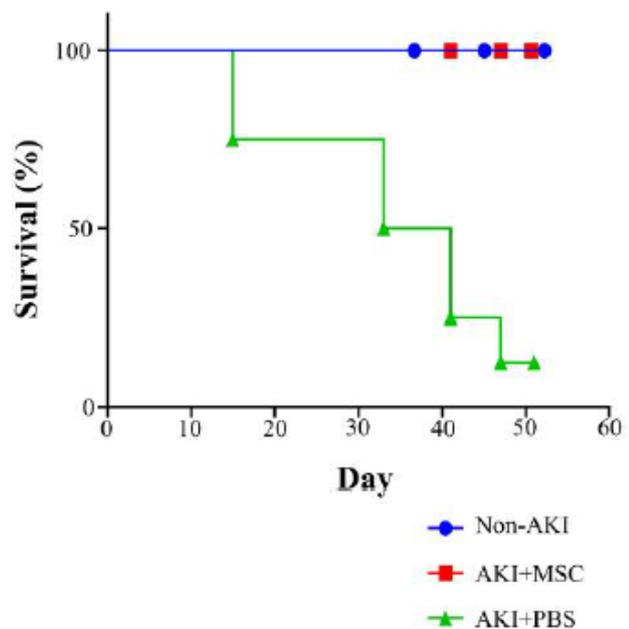


Figure 4. Survival rate in the acute kidney injury (AKI)+mesenchymal stem cell (MSC) group (n=3) versus the AKI+phosphate buffer solution (PBS) group (n=8) and non-AKI group (n=3). Survival rate was measured from day 0 to day 51 (the end point of the experiment). Statistical analysis of survival rate was performed by log-rank test for trend (p=0.007).

「腎機能評価：BUN・クレアチニン」

- ・腎障害改善の指標として BUN およびクレアチニンを測定した。
- ・AKI 誘発後、6 日間連続で BUN・クレアチニンは上昇を続けた。
- ・day6：1 回目の投与（cUCB-MSCs、PBS）
- ・1 回目投与後：cUCB-MSCs⇒BUN・クレアチニンの低下、PBS⇒低下はみられなかった
- ・day23：2 回目の投与（cUCB-MSCs、PBS）
- ・2 回目投与後：cUCB-MSCs⇒BUN・クレアチニンは試験終了時まで低下を続けた。（Figure.5A,C）
- ・BUN、クレアチニンそれぞれの最大値(highest value)と試験終了時の値(last value)で評価（last value/highest value）した場合、大きな差がみられた。（Figure.5B,D）
- ・cUCB-MSCs 投与によって犬の AKI モデルの腎機能の改善が認められた。

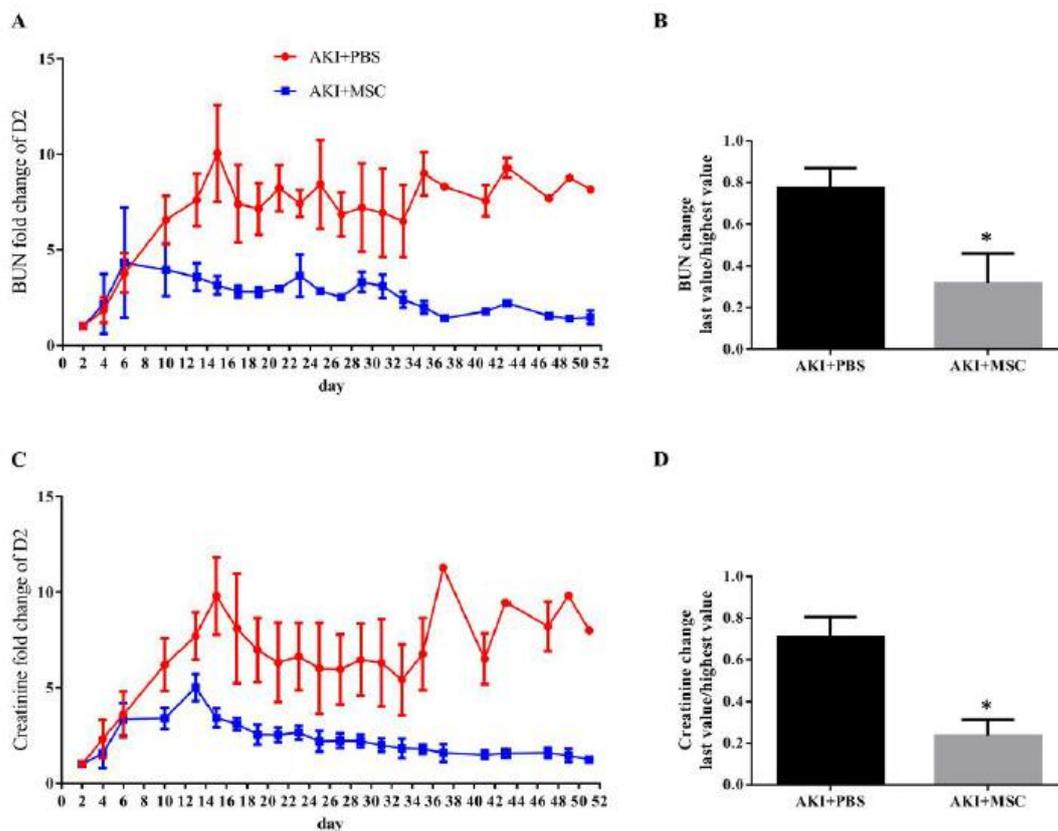


Figure 5. Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels. A: BUN levels were measured throughout the experimental period. B: The highest value after induction of acute kidney injury (AKI) and the last value of BUN were compared. C: Creatinine levels were measured throughout the experimental period. D: The highest value after inducing AKI and the last value of creatinine were compared. Data for the AKI+phosphate-buffer solution (PBS) group (n=8) and AKI+mesenchymal stem cell (MSC) group (n=3) are shown, those for the non-AKI group are not shown. *Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney test (BUN: $p=0.0485$, creatinine: $p=0.0121$).

「組織学的分析」

- ・実験終了時、腎臓は回収され組織学的分析が行われた。
- ・PBS グループの腎臓表面は薄くて荒い（Figure.6A）（non-AKI グループの腎（Figure.6C）との比較）
- ・一方で、cUCB-MSCs グループの腎臓のダメージは PBS グループに比べて小さい（Figure.6B）

- 腎皮質および髄質の変性や壊死を観察した。(Figure.6D-O)
- 病態をなし・軽度・中程度・重度の4つに分類した。
- 管状壊死：cUCB-MSCs⇒中程度、PBS⇒重度
- 管状上皮細胞の脱落：cUCB-MSCs⇒軽度～中程度、PBS⇒重度
- 糸球体壊死：cUCB-MSCs⇒中程度、PBS⇒重度
- 以上から、cUCB-MSCs投与は犬のAKIモデルで腎機能障害を改善することが示された。

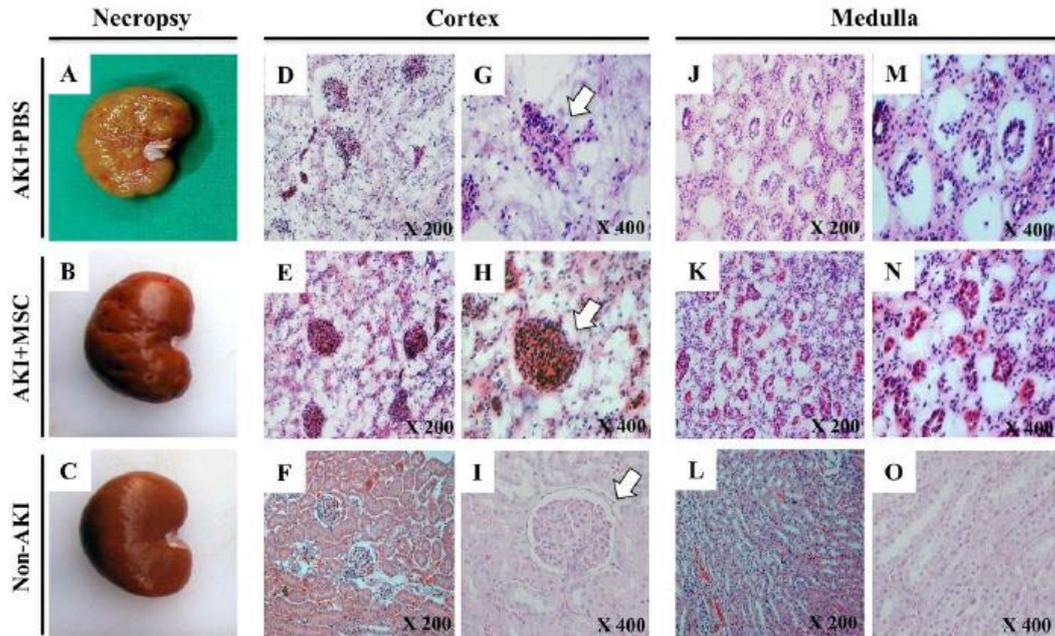


Figure 6. Histological manifestation of the kidneys after transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell (cUCB-MSC) into dogs with induced acute kidney injury (AKI). At day 51, all dogs were euthanized, and their kidneys were harvested for histological examination. A-C: Gross features of the kidneys. D-I: The renal cortex at low (D, E, F) and at high (G, H, I) magnification. J-O: The renal medulla at low (J-L) and at high (M-O) magnification. White arrows indicate the renal glomerulus.

「GFP ラベリング」

- 腎臓での cUCB-MSCs の存在を確認するために GFP でラベリングし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- GFP-positive cells が cUCB-MSCs グループの腎臓の皮質でのみ確認された (Figure.7B,C,E,F)。
- それらの細胞のほとんどは腎細管でみられた。
- PBSグループおよび non-AKIグループでは GFP-positive cells はみられなかった (Figure.7G-J)。

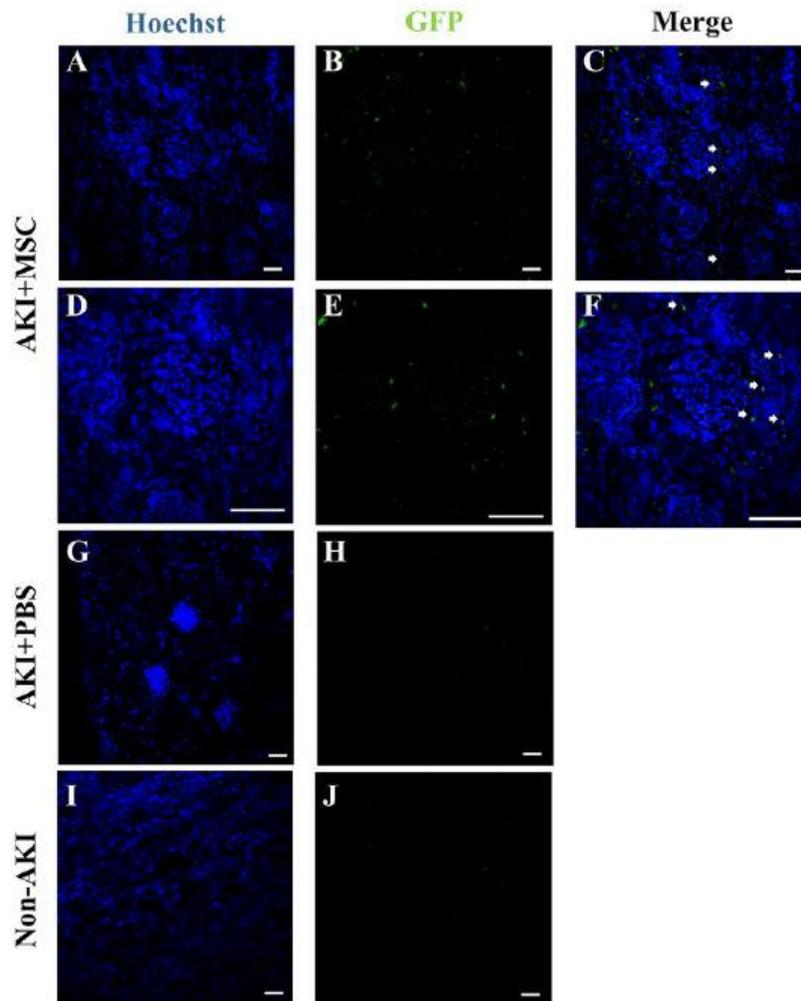


Figure 7. Detection of transplanted mesenchymal stem cells in the kidneys of dogs with and without acute kidney injury (AKI). Cell transplantation with green fluorescent protein (GFP)-labelled canine umbilical blood-derived mesenchymal stem cells (cUCB-MSCs) was confirmed by confocal laser microscopy. Hoechst 33238 stained the nuclei in all kidneys. GFP-positive cells were detected in tubules in the AKI+MSC group (A-F, white arrows indicate GFP-positive cells, scale bar=50 μ m). The kidneys of the AKI+PBS and I groups did not show the presence of GFP-positive cells (G-J, scale bar=50 μ m).

《まとめ》

- cUCB-MSCs グループの方が PBS グループと比較して BUN およびクレアチニンの濃度が低下した。
- cUCB-MSCs グループでは実験終了まで死亡個体がみられなかった。
- 本実験は、犬の AKI モデルにおいて cUCB-MSCs が有効な治療法であることを示唆している。

《原文アクセス》

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29102933>