～他家脂肪幹細胞は犬の急性肝障害を改善する～

Allogenic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Acute Hepatic Injury in Dogs

Takahiro Teshima et al. (2017) *Srtem Cells International*

≪Intro≫

・間葉系幹細胞（MSC）が急性もしくは慢性の肝疾患モデルに治療改善効果があることが報告されている。

・しかし、獣医領域において肝疾患に対する脂肪由来間葉系幹細胞（AT-MSCs）の効果を評価した報告はない。

・本研究では、急性肝障害の犬に対して他家 AT-MSCs を投与した際の治療効果を検討する。

≪モデル動物≫

・9 匹の健康なビーグルを供試（♂、平均年齢：1.5 歳、平均体重：12.2kg）

・グループ：コントロール（n=3）

末梢静脈投与（PV）（n=3）

脾静脈投与（SV）（n=3）

≪実験デザイン≫

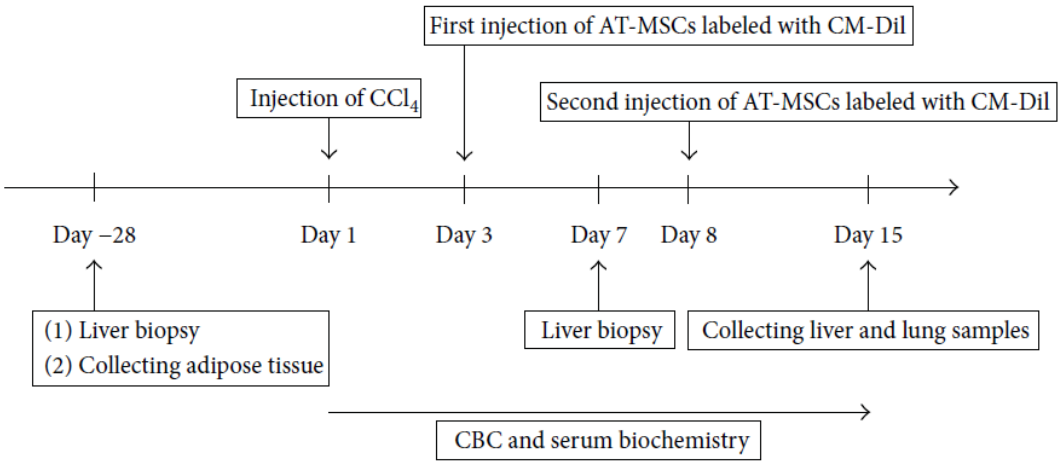

FIGURE 1: Experimental design. AT-MSCs: adipose tissue-derived stem cells; CBC: complete blood count; CCl4: carbon tetrachloride.

・-Day28：コントロール群の犬から麻酔下で鎌状靭帯脂肪を採取し、AT-MSCs を培養

・Day1：急性肝障害モデルの誘発

⇒麻酔鎮静下、超音波ガイド下で 0.25ml/kg の四塩化炭素（CCl_4）を腹腔内投与

・Day3：AT-MSCs 投与（初回）

・Day8：AT-MSCs 投与（2 回目）

«表面マーカー»

・P2 の AT-MSCs をフローサイトメトリーで解析

・CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD90 の表面マーカーを検査

«分化能»

・骨分化能：von Kossa 染色

・脂肪分化能：オイルレッド O 染色

«AT-MSCs 投与»

・AT-MSCs を CM-Dil でラベリングして投与（Figure.2）

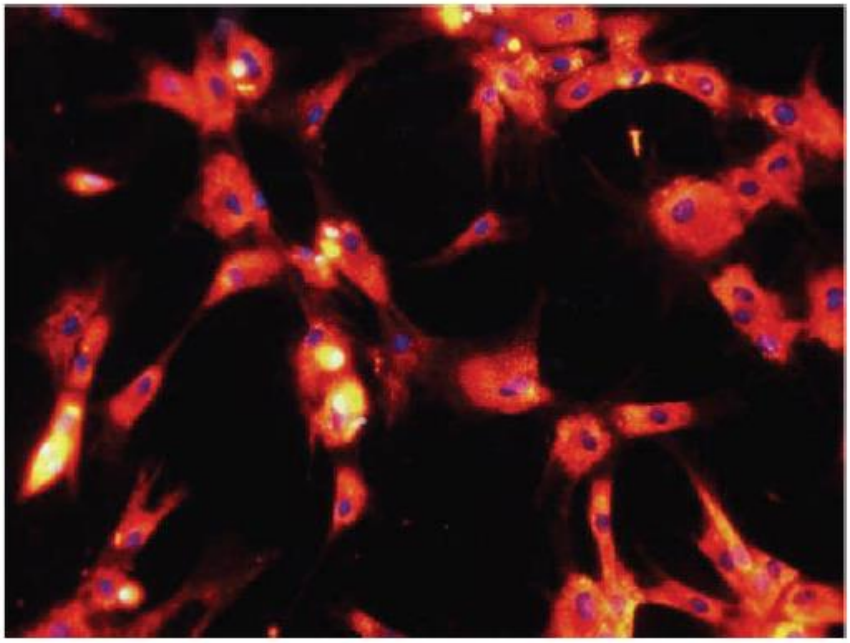

FIGURE 2: AT-MSCs labeled with CM-Dil before injection. Approximately 95% of AT-MSCs were labeled with CM-Dil according to the manufacturer's procedure. AT-MSCs were mounted in VECTASHIELD-mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) as a nuclear counterstain.

・投与は全個体麻酔下で Day3 および Day8 に実施

・PV：橈側皮静脈から 2×10^6cells/kg 投与

・SV：超音波ガイド下で脾静脈に 2×10^6cells/kg 投与

・コントロール：0.9%生理食塩水を静脈投与

«肝酵素および白血球検査»
・急性肝障害の評価のために、白血球および肝酵素値（ALT、AST、ALP）を毎日測定

«肝生検»
・Day7 に全個体に腹腔鏡下で肝生検を実施（麻酔鎮静下）

«形態学的評価»
・Day15：全個体を安楽死させ、肝臓の各葉と右肺後葉の組織をサンプリング
・Day7、Day15 にサンプリングした各組織はパラホルム固定され RNA 検査を実施
・肝臓の組織はパラフィン包埋され 4μm 切片とし、HE 染色およびマッソントリクローム染色（MT）
・組織の線維化を定量化し評価

«免疫組織学的染色»
・炎症性細胞浸潤の定量のためにミエロペルオキシダーゼおよび CD163 陽性細胞をカウント

«AT-MSCs の生着»
・肝臓と肺のサンプルで CM-DiI をカウントし、各組織での生着を評価した

«サイトカイン測定»
・肝臓でのサイトカイン発現をリアルタイム定量 PCR を用いて評価
・サイトカイン：IL-1β、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、TNFα、IFNγ、HGF、VEGFA

【結果】
«AT-MSCs の特徴»
・表面マーカー発現（Figure.3）：CD29（95.2％）、CD44（91.6％）、CD90（99.4％）、CD14（0.8％）、CD34（0.6％）、 CD45（0.7％）

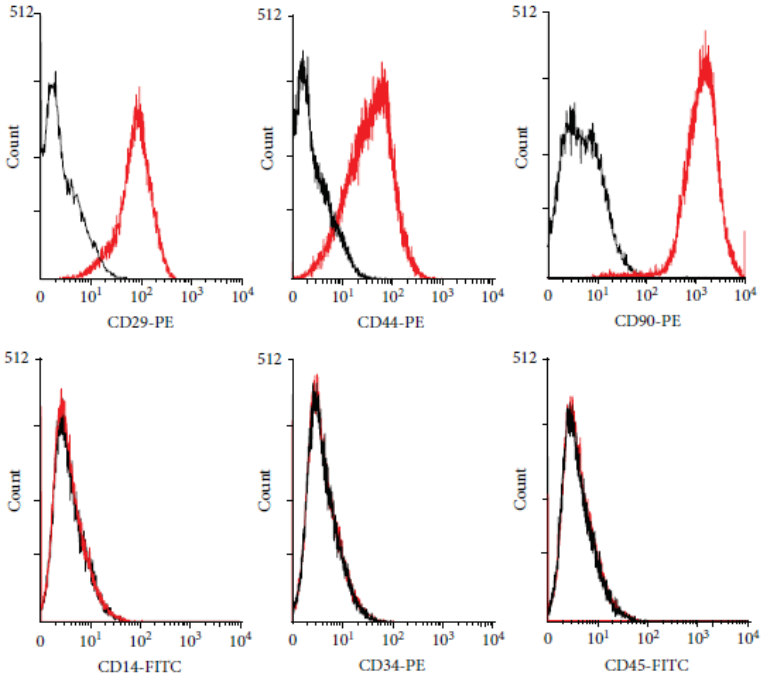

FIGURE 3: Results of flow cytometry. Black lines represent isotype controls and red lines indicate AT-MSCs. AT-MSCs were positive for CD29, CD44, and CD90 and negative for CD14, CD34, and CD45.

・分化能：脂肪および骨分化能を示した（Figure.4）

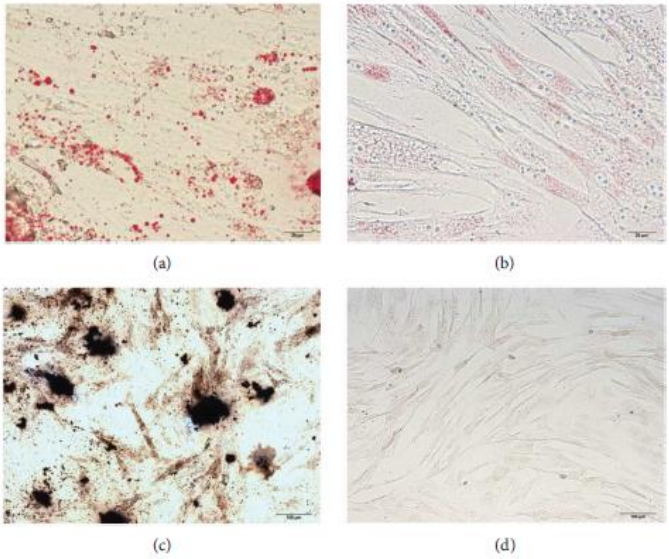

FIGURE 4: Multilineage differentiation of canine AT-MSCs. (a) Adipogenic differentiation was identified by Oil Red O staining. (b) Oil Red O staining of control undifferentiated cells. (c) Osteogenic differentiation was identified by von Kossa staining. (d) von Kossa staining of control undifferentiated cells.

・Fig.4-a：脂肪分化能（オイルレッド O 染色）

・Fig.4-b：オイルレッド O コントロール（未分化）

・Fig.4-c：骨分化能（von Kossa 染色）

・Fig.4-d：von Kossa コントロール（未分化）

«肝酵素および白血球»（Figure.5）

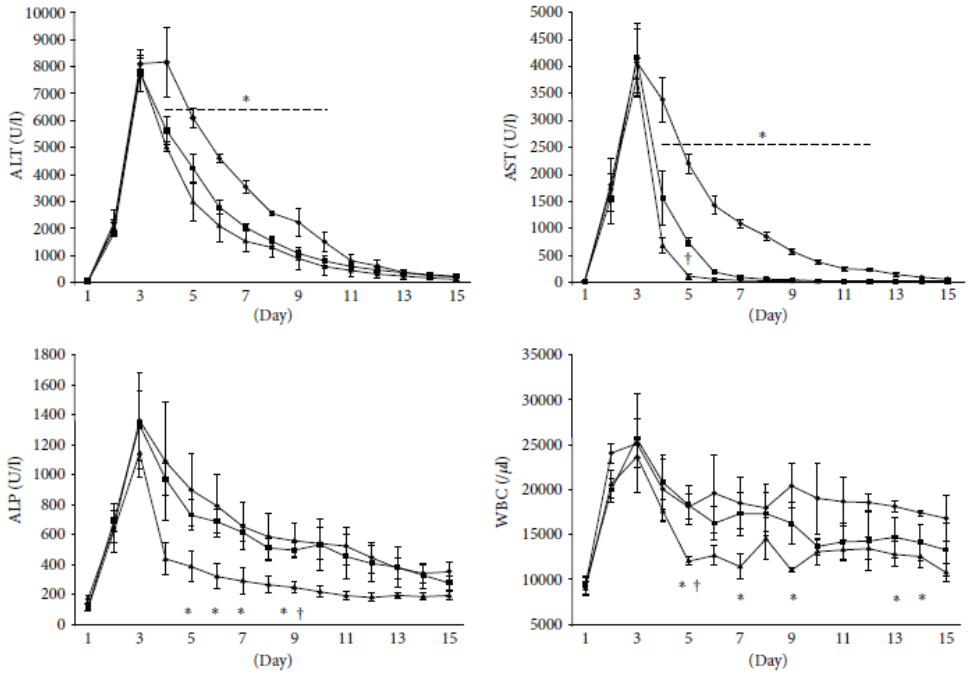

FIGURE 5: Serum levels of ALT, AST, and ALP and white blood cell counts. Data are expressed as the mean ± standard deviation. ◆: control group; ■: PV group; ▲: SV group. ALT levels in PV and SV groups were significantly decreased from day 4 to day 10 compared with the control. AST levels in PV and SV groups were significantly decreased from day 4 to day 12 compared with the control. $^{*}P < 0.05$ versus control group; $^{\dagger}P < 0.05$ versus PV group.

[ALT]

・PV および SV では初回 AT-MSCs 投与翌日（Day4）には低下していたが、コントロールでは Day5 で低下がみられた

・Day4：PV と SV はコントロールに比べて有意な減少がみられた（P<0.05）

PV⇒5635±650 U/L、SV⇒5023±223 U/L、コントロール⇒8186±1576 U/L

[AST]

・Day4：PV と SV はコントロールに比べて有意な減少がみられた（P<0.05）

PV⇒1565±611 U/L、SV⇒695±175 U/L、コントロール⇒3388±511 U/L

・Day5：SV は PV に比べて有意な減少がみられた（P<0.05）

PV⇒753±92 U/L、SV⇒131±65 U/L、

[ALP]

・Day5：SV はコントロールに比べて有意な減少がみられた（P<0.05）

PV⇒729±128 U/L、SV⇒384±128 U/L、コントロール⇒896±295 U/L

・Day9：SV は PV に比べて有意な減少がみられた（P<0.05）

PV⇒494±65 U/L、SV⇒243±49 U/L、

[白血球]

・Day5：SV は PV とコントロールに比べて有意な減少がみられた（P<0.05）

PV⇒18,300±2605 /μL、SV⇒12,066±585 /μL、コントロール⇒18,133±1724 /μL

«線維化と炎症性細胞の浸潤»

・Day7 および 14：炎症性細胞の浸潤、幹細胞の変性、中心静脈の萎縮や出血が全てのグループでみられた（Figure.6）

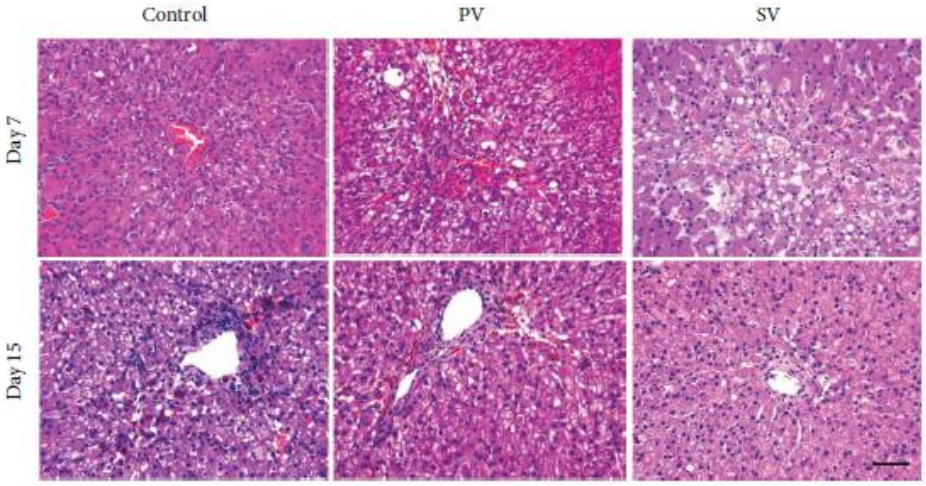

FIGURE 6: Histopathology of livers after AT-MSC injections. Inflammatory cell infiltration and necrosis in livers were observed at both of day 7 and 15. H&E staining. Bar = 50 μm.

・Day7 および 15：中心静脈周囲のコラーゲン沈着がすべてのグループでみられた（Figure.7）

・Day7：コントロールは PV と SV に比べて線維化の割合が有意に高かった（P<0.05）

コントロール⇒10.0±1.7%、PV⇒4.6±1.6%、SV⇒2.7±0.8%

・Day15：コントロールは PV と SV に比べて線維化の割合が有意に高かった（P<0.05）

コントロール⇒8.9±1.4%、PV⇒3.7±1.0%、SV⇒2.5±0.5%

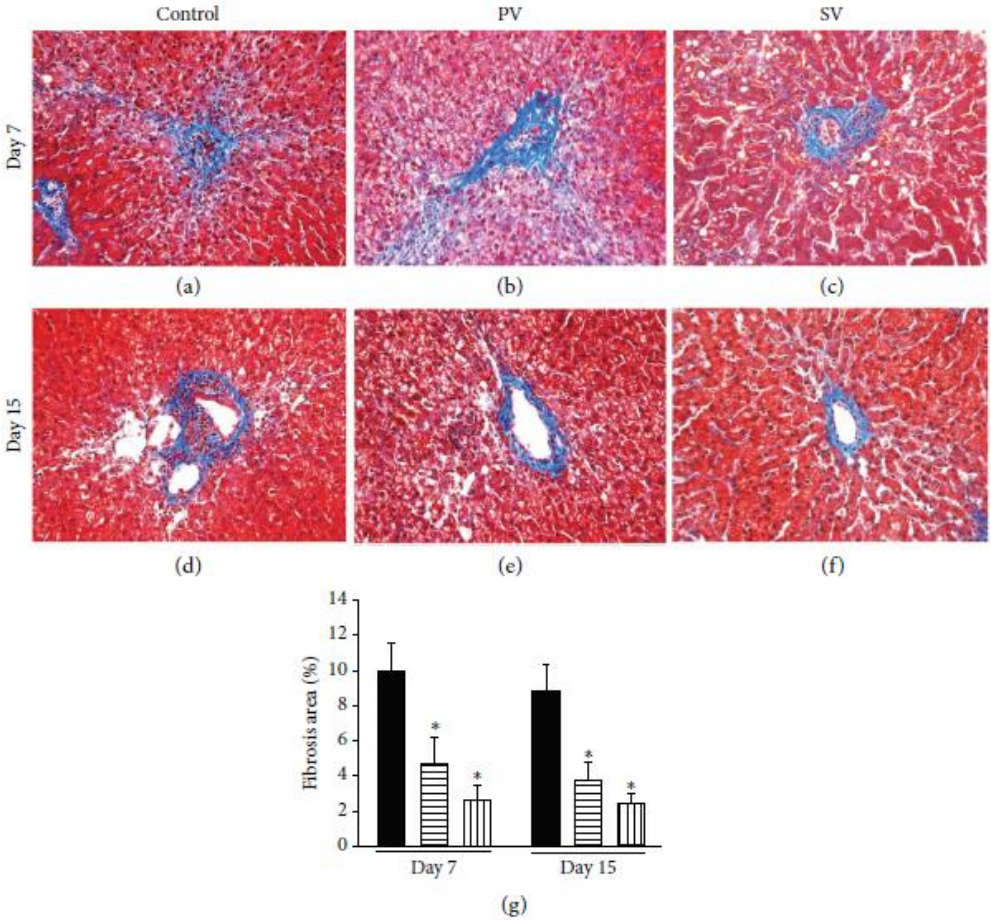

FIGURE 7: Hepatic fibrosis around the central vein at days 7 and 15. The degree of distribution of collagen deposition on day 7 (a, b, c) was higher than that on day 15 (d, e, f) in all groups. Comparison of the quantification of fibrosis area in liver sections (g). The fibrosis around the central vein in the control group was more apparent than that in the PV and SV groups. ■: control group; ▤: PV group; ▥: SV group. Data are expressed as the mean ± standard deviation. * $P < 0.05$. MT staining. Bar = 50 μm.

・好中球およびマクロファージは、それぞれミエロペルオキシダーゼ（MPO）および CD163 で染色された
⇒炎症性細胞数（MPO^{+}＋$CD163^{+}$）としてカウント（Figure.8）

・Day7：PV と SV の炎症性細胞数はコントロールに比べて少なかった

PV⇒39.0±3.8 cells/HPF、SV⇒32.2±3.5 cells/HPF、コントロール⇒45.2±10.2 cells/HPF

・Day15：コントロールの炎症性細胞数は PV と SV に比べて有意に多かった（P<0.05）

PV⇒40.4±6.1 cells/HPF、SV⇒32.0±4.5 cells/HPF、コントロール⇒77.8±8.4 cells/HPF

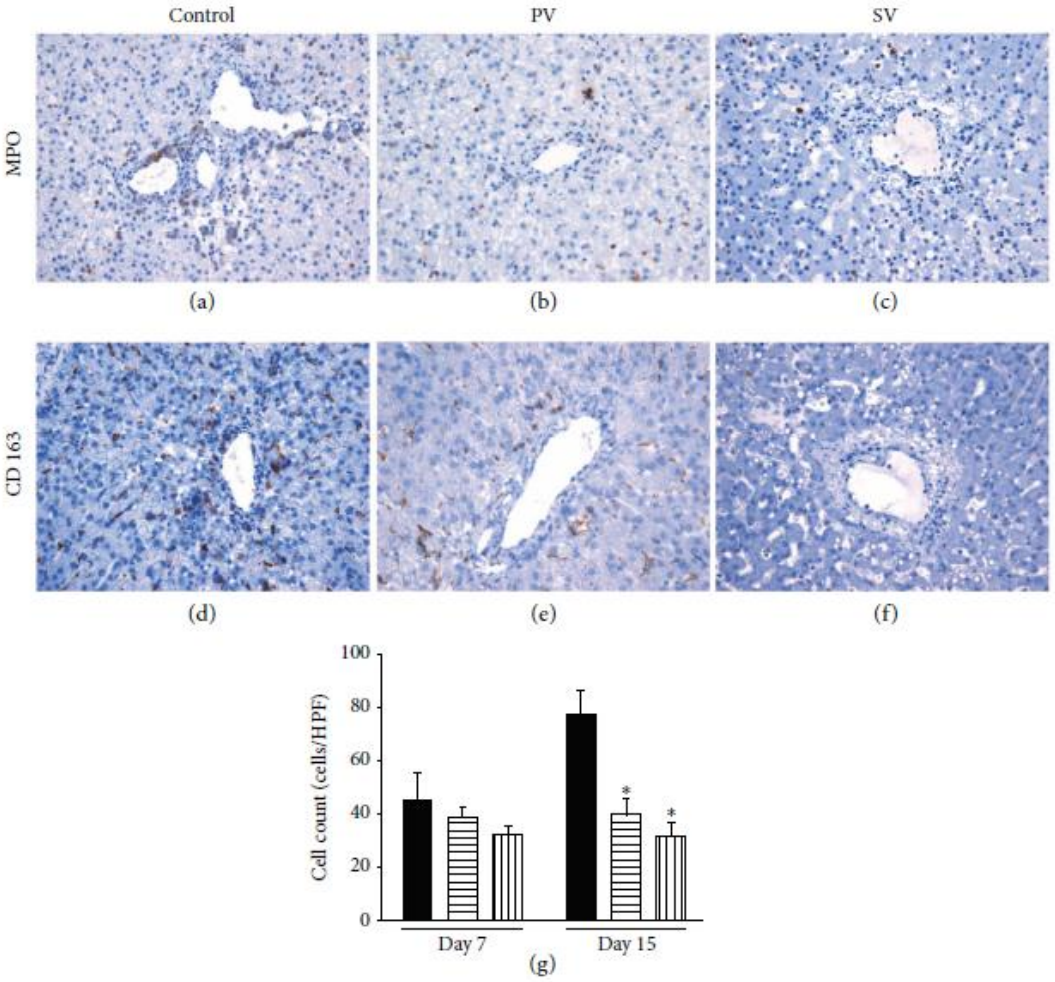

FIGURE 8: Inflammatory cell infiltration around the central vein in the liver. The myeloperoxidase (MPO) and CD163 positive cells at day 15 are shown (a–f). Comparison of the number of inflammatory cells in liver sections (g). ■: control group; ▤: PV group; ▥: SV group. Data are expressed as the mean ± standard deviation. * $P < 0.05$.

«AT-MSCs の生着»

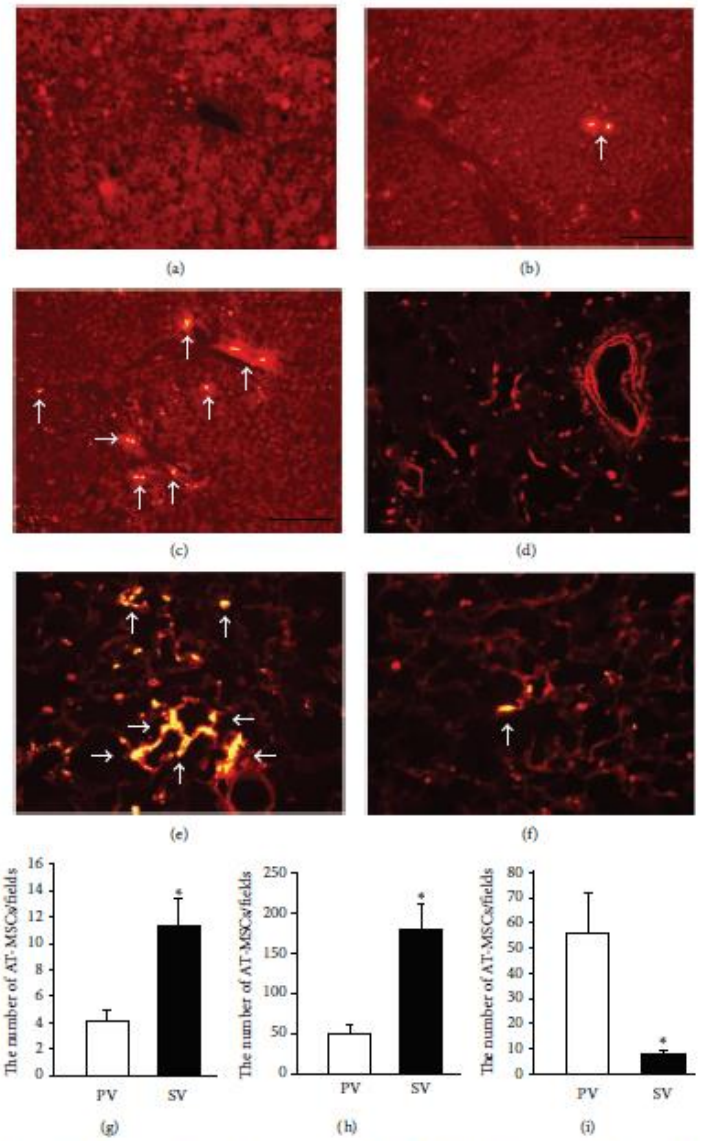

FIGURE 9: Engrafted AT-MSCs in liver and lung lobe sections. Liver (a) and lung (d) lobe sections of the control group. More AT-MSCs labeled with CM-DiI (white arrows) were found in liver lobe sections of the SV group (c) than in those of the PV group (b). In contrast, more AT-MSCs labeled with CM-DiI (white arrows) were found in lung lobe sections of the PV group (e) than in those of the SV group (f). Comparison of the number of AT-MSCs labeled with CM-DiI per field in liver sections at day 7 (g) and day 15 (h). Comparison of the number of AT-MSCs labeled with CM-DiI per field in lung sections at day 15 (i). Data are expressed as the mean ± standard deviation. $^{*}P < 0.05$.

・Day7：肝臓の AT-MSCs 細胞数は SV が PV の 2.8 倍多い（P<0.05）（Figure.9-g）

PV⇒4.0±0.8 cells、SV⇒11.3±2.1 cells

・Day15：肝臓の AT-MSCs 細胞数は SV が PV の 3.7 倍多い（P<0.05）（Figure.9-h）

PV⇒49.0±11.0 cells、SV⇒181.7±31.6 cells

・Day15：肺の AT-MSCs 細胞数は SV が PV に比べて有意に少ない（P<0.05）（Figure.9-i）

PV⇒56.0±16.1 cells、SV⇒8.0±1.6 cells

≪炎症性サイトカイン≫（Figure.10）

・TNFα：Day7 および 15 でどのグループにおいても差はなかった

・IL-1β、IL-6、IL-8、IFNγ：Day7 および 15 で SV がコントロールと比べて有意に減少（P<0.05）

・IL-6、TNFα：Day7 で PV がコントロールと比べて有意に減少（P<0.05）

≪抗炎症性サイトカイン≫（Figure.10）

・IL-4、IL-10：Day7 で SV が PV とコントロールに比べて有意に増加（P<0.05）

Day15 で SV が PV に比べて有意に減少（P<0.05）

≪HGF および VEGFA≫（Figure.10）

・HGF：Day7 で SV がコントロールと比べて有意に増加（P<0.05）

・VEGFA：Day7 で PV と SV がコントロールと比べて有意に増加（P<0.05）

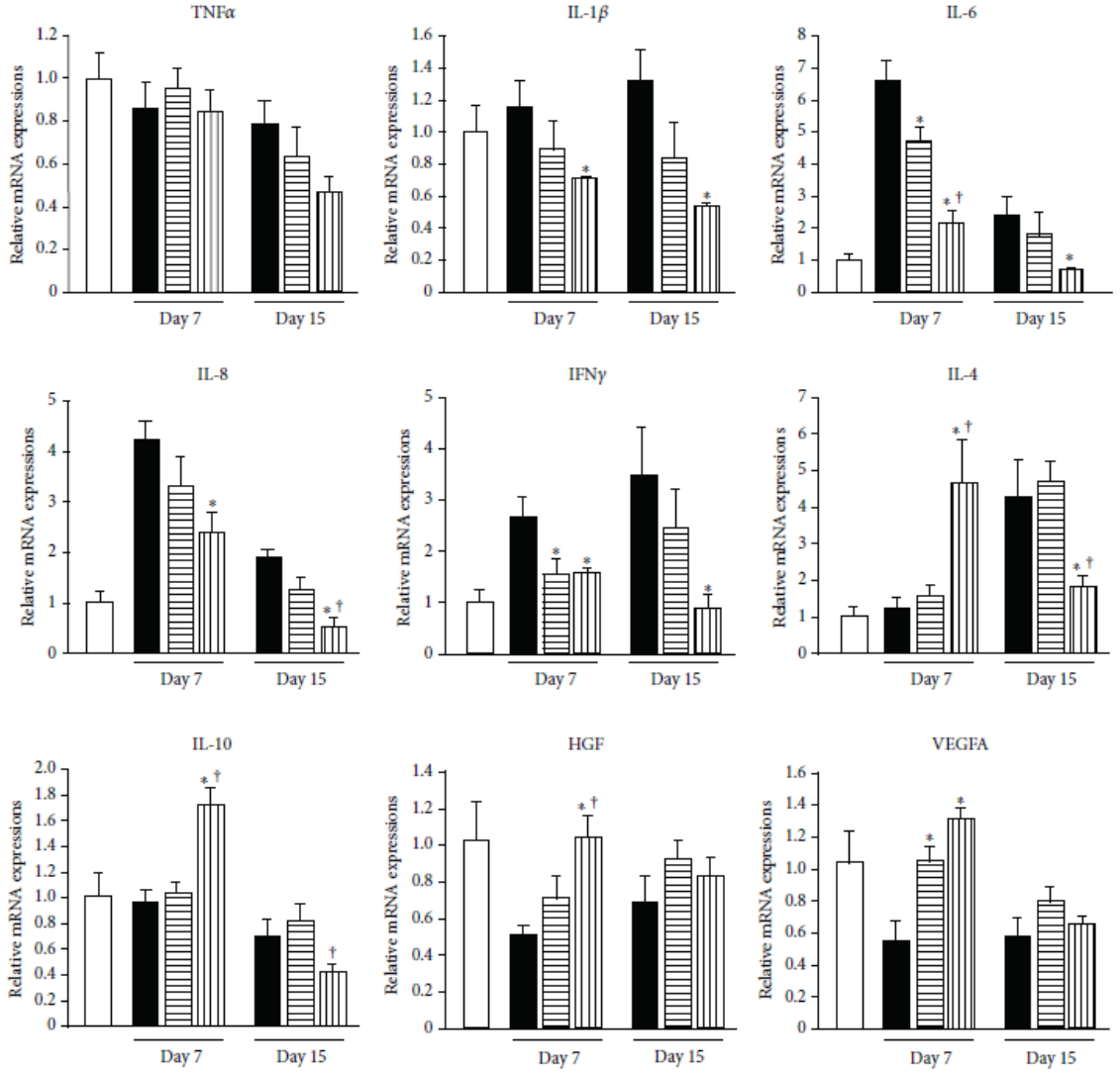

FIGURE 10: Comparison of mRNA expression in livers at day 7 and day 15. □: normal liver samples obtained from all nine dogs at 28 days before injection of CCl_4, ■: control group; ▤: PV group; ▥: SV group. Data are expressed as the mean ± standard deviation. $^{*}P < 0.05$ versus control group; $^{\dagger}P < 0.05$ versus PV group.

≪まとめ≫

・肝細胞の障害によって ALT、AST、ALP の顕著な増加がみられた

・AT-MSCs の初回投与後に PV と SV において ALT および AST の有意な減少がみられ、SV において ALP の有意な減少がみられた

・SV に比べて PV の方が多くの AT-MSCs が肺にトラップされていたが、AT-MSCs が傷ついた箇所にホーミングする能力も認められた

・ALT や AST といった血清学的パラメーターは SV と PV は同じような変化を示したが、形態学的な変化やサイトカインの発現については SV の方が PV に比べてより効果を示した

・本研究では他家 AT-MSCs が急性肝障害の改善に効果があることが示唆された

・また、PV より SV の方がより効果的であると示唆されるが、このことは肝臓への AT-MSCs の生着細胞数と関連があると考えらえる

・今後も、肝疾患の AT-MSCs 投与のさらなる研究が必要である

≪原文アクセス≫

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445402