

## ～猫好酸球性角膜炎への間葉系幹細胞の安全性と有効性～

### Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment

Antonio J. Villatoro et al. (2018) *BMC Veterinary Research*

#### «Intro»

- 好酸球性角膜炎（FEK）は猫に特有の慢性、変性性、浸潤性の角膜疾患である。
- 発症の原因はよくわかっていないが、I型やIV型アレルギー反応の免疫機能の不全によると考えられている。
- また、猫ヘルペスウイルス-1（FHV-1）も病因に関与していると考えられている。
- FEKの標準治療はコルチコステロイドやシクロスポリン A といった免疫抑制剤である。
- 本研究では他家ネコ脂肪由来間葉系幹細胞（fAd-MSCs）の安全性と有効性について検証する。

#### «供試動物»

- 5匹の猫（5 eyes）がエンロール（♂3匹、♀2匹、年齢：3-6歳、体重：3.2-4kg）（Table.1）
- FEKの臨床症状が認められて6-12カ月（平均9ヶ月）経過し、標準治療に反応しなかった猫
- エンロール2週間前から試験終了まで抗炎症剤や免疫抑制剤の投与はなし。
- follow up 期間は11カ月。

#### «臨床評価»

- 眼検査：STT試験、フルオレセイン染色、眼圧測定、スリットランプ検査、眼底検査（間接検眼法）
- それぞれの眼の状態はTable.1に記載。

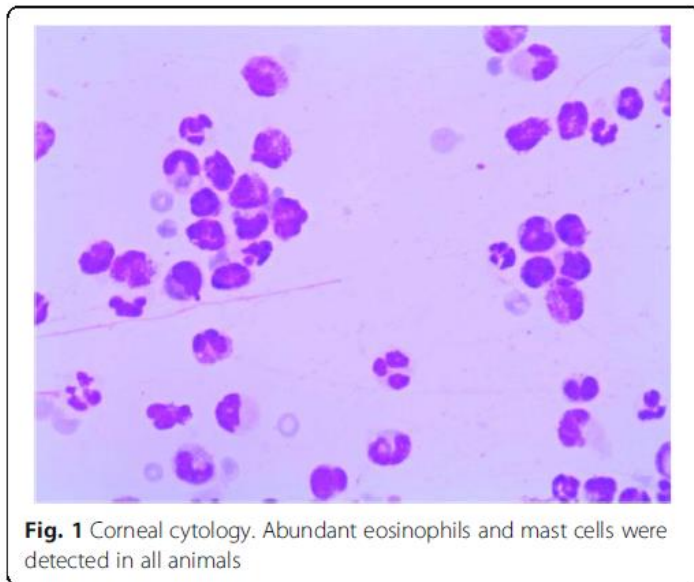
**Table 1** Summary of signalment, clinical data and evolution for veterinary patients

Parameter	Cat-1	Cat-2	Cat-3	Cat-4	Cat-5
Age (years)	4	4	5	6	3
Sex	MC	MC	MC	FS	FS
Breed	DSH	DSH	DSH	DSH	DSH
Weight (kg)	3.2	3.8	3.8	4	4.1
Duration (months)	12	9	8	10	6
Eye	R	L	L	R	R
Lesion localization	ST	ST	IN	IN	ST
FHV-1	-	+	+	+	+
Clinical signs	PL, V, H	PL, V, ED, H	PL, V, ED, H	PL, V, H	PL, V, H
STT	14	18	16	21	19
Cytology	E, M	E, M	E, M, N	E, M	E, M
Previous treatment	C, Ca, Ao	Ca, Ly, Ao	Ca, C, Ly, Ao	Ca, C, Ly, IQ, Ao	Ca, Ly, IQ, Mg, Ao
Clinical remission	2 months	2 months	6 months	4 months	5 months
Hematologic changes	No	No	No	No	No

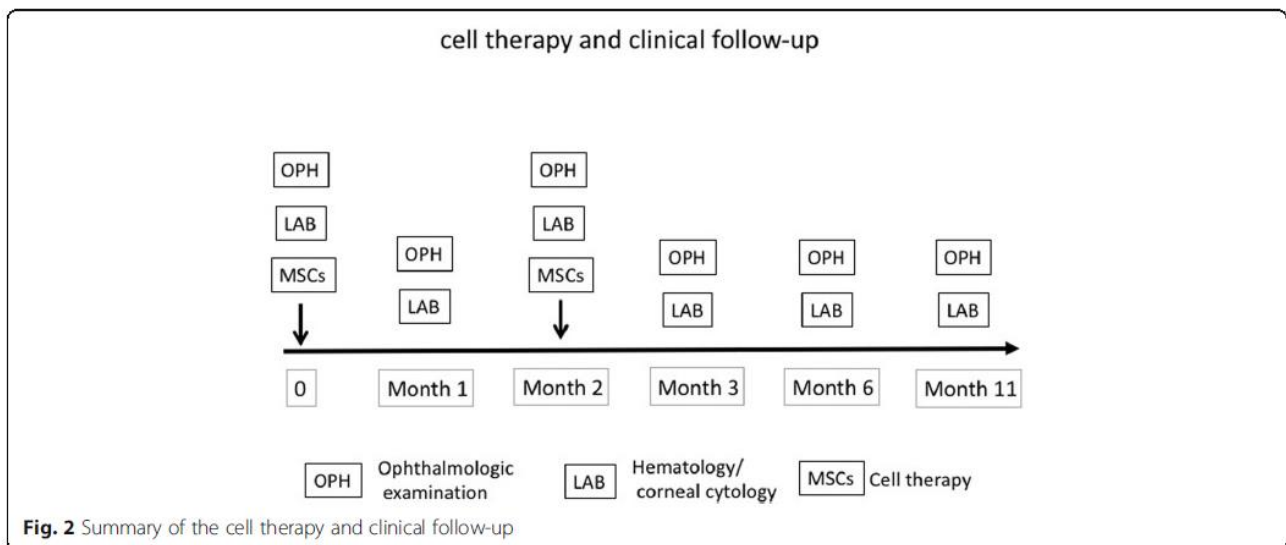
MC, male castrated; FS, female spayed; DSH, domestic short hair; R, right eye; L, left eye; ST, superotemporal quadrant; IN, inferonasal quadrant; FHV-1, feline herpes virus 1; PL, corneal infiltrative plaque; V, vascularization; H, hyperemia; ED, corneal edema; STT, Schirmer tear test; E, eosinophils; M, mast cells; N, neutrophils; C, topical corticosteroids; Ca, topical cyclosporine A; Ao, antibiotics; Ly, L-lysine; IQ, topical interferon omega; Mg, oral megestrol acetate

Clinical signs [PL:角膜浸潤性プラーク, V:血管新生, H:充血, ED:角膜浮腫]

- 全ての眼に角膜血管新生と浸潤、結膜および角膜の充血がみられた。
- いずれの症例も角膜潰瘍は示さず、フルオレセイン染色も陰性だった。
- 眼の変化は角膜および結膜に限定され、他のすべての眼科的パラメータは正常だった。
- 角膜細胞診で全ての症例から多くの好酸球および肥満細胞が検出された (Fig.1)。



- PCR 検査で 4 匹の猫で FHV-1 を検出。
  - 血液検査および血清学的検査でも著変なし。
  - 投与 1,2,3,6,11 か月時点で各フォローアップを実施した (Fig.2)
- [OPH:眼検査, LAB:血液検査/角膜細胞診, MSCs:細胞治療]



«fAd-MSCs の培養»

- SPF 猫の腹部皮下脂肪を採取し、培養。
- 培養した細胞は凍結保存し、投与および実験は P2 細胞を利用した。

«細胞増殖»

- 細胞増殖の測定は 96 穴プレートに 3000 個 fAd-MSCs を播種し、0,3,5,7,11,14,18,21,25,28 日に 490nm 吸光度を測定した。

«フローサイトメトリー法»

- FACS で CD29,CD34,CCD44、CD45,CD73,CD90,MHC- I ,MHC- II ,STRO-1,Anti-mouse IgM を測定 (Table.2)

**Table 2** Antibodies used for flow cytometry

Antibody	Supplier	Clone	Isotype	Fluorochrome
CD29	Miltenyi Biotech	TS2/16	IgG1 κ	PE
CD34	Miltenyi Biotech	AC136	IgG2a	FITC
CD44	Miltenyi Biotech	DB105	IgG1	APC
CD45	Miltenyi Biotech	5B1	IgG2a	APC
CD73	BD Pharmingen	AD2	IgG1 κ	PE
CD90	Miltenyi Biotech	DG3	IgG1	APC
MHC-I	BD Pharmingen	G46-2.6	IgG1 κ	FITC
MHC-II	BD Pharmingen	G46-6	IgG2a κ	PE
STRO-1	R&D Systems	STRO-1	IgM λ	Pure
Anti-mouse IgM	AbD Serotec	3A6	Polyclonal	PE

«分化能»

- 脂肪細胞、骨細胞：、軟骨細胞への分化能を調べた。

«免疫調整能»

- リンパ球増殖抑制試験：PBMCs の増殖を測定し、比較した (Con A で刺激した場合を 100%とする)

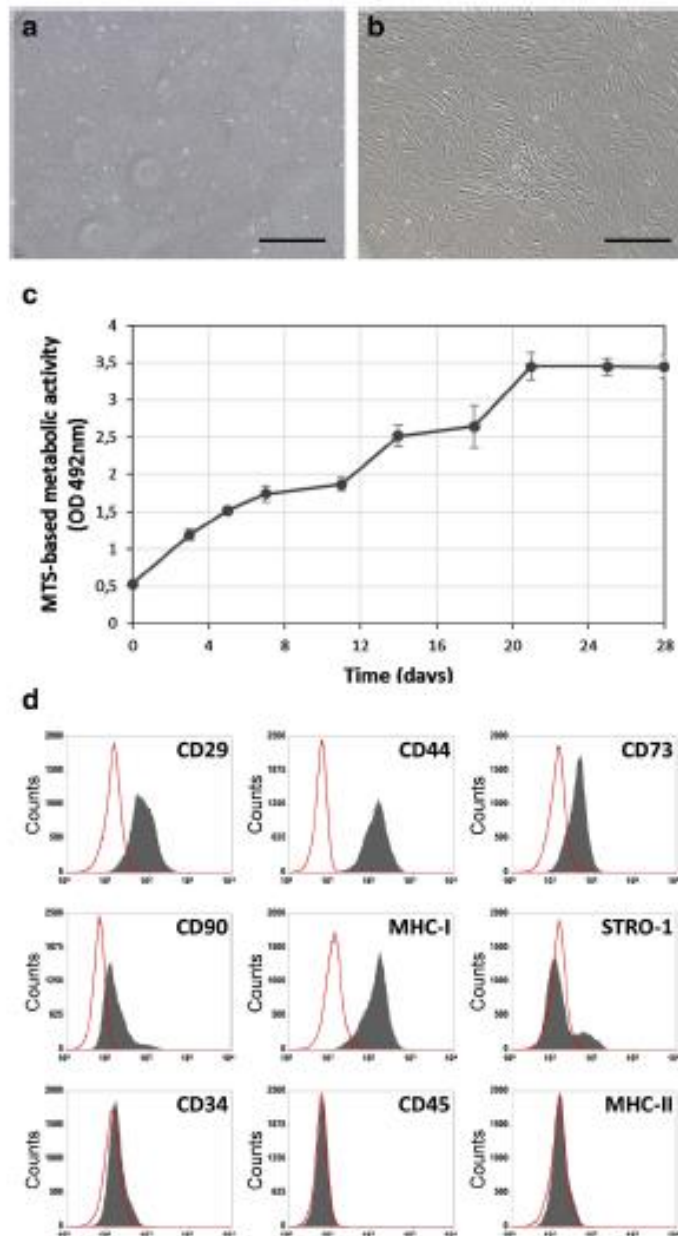
«細胞投与»

- 麻酔鎮静下で、21G 針を用い結膜下に局所投与。
- 投与量： $2 \times 10^6$  cells (0.4mL DMEM で懸濁)。
- 初回投与 2 ヶ月後に 2 回目を投与。(計 2 回投与)

【結果】

«fSd-MSCs»

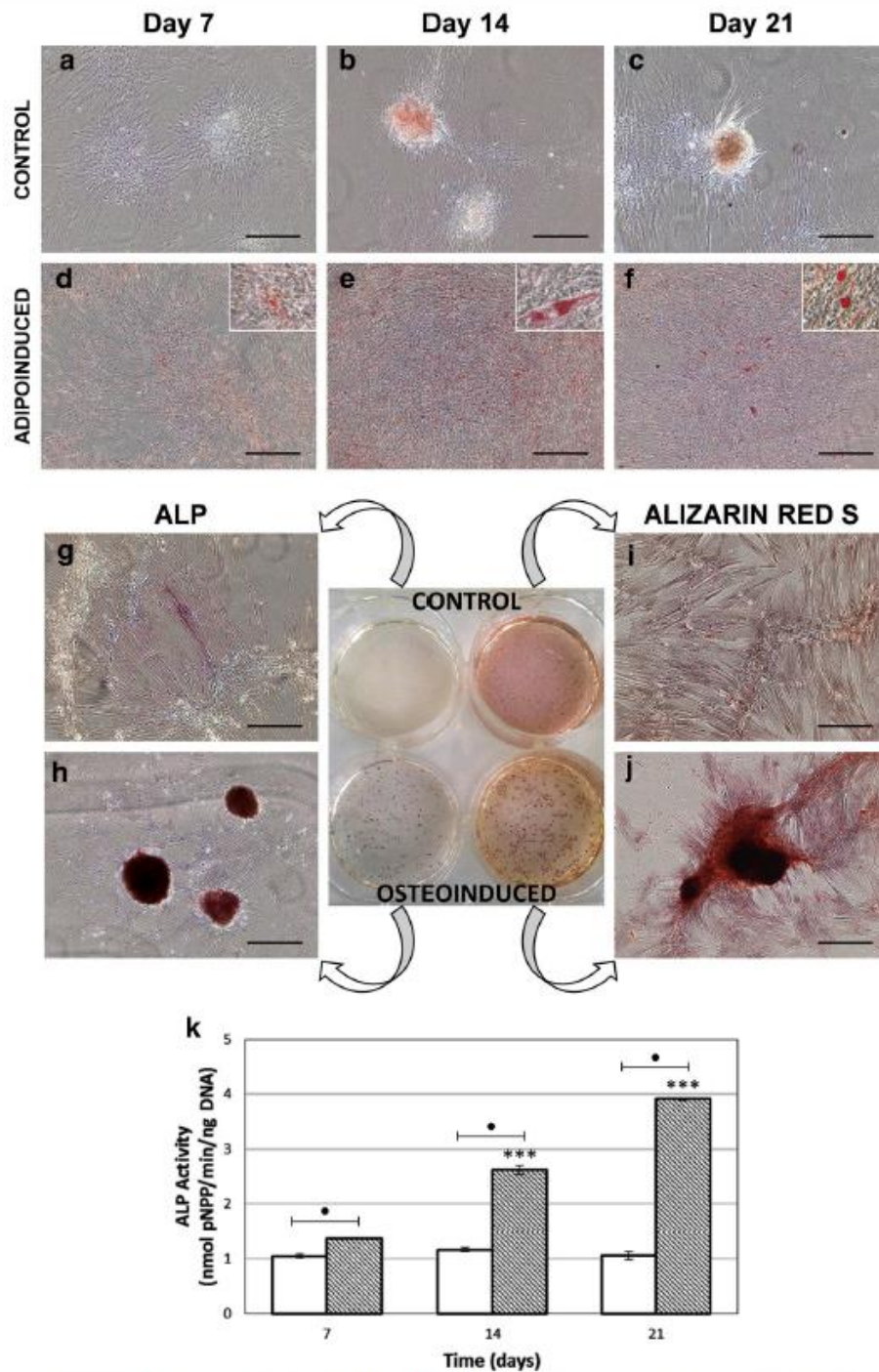
- fAd-MSCs の増殖は問題なく、紡錘形細胞の増殖を認めた。(Fig.3-a,b)
- 細胞増殖は MTS アッセイで測定され、細胞は播種後すぐに増殖を始め、21 日後にはプラトーに達した。(Fig.3-c)
- フローサイトメトリー (Fig3-d)
  - ⇒ CD29、CD44、CD73、CD90、MHC- I (間葉系幹細胞マーカー) は陽性
  - ⇒ CD34、CD45、MHC- II (造血性マーカー) は陰性



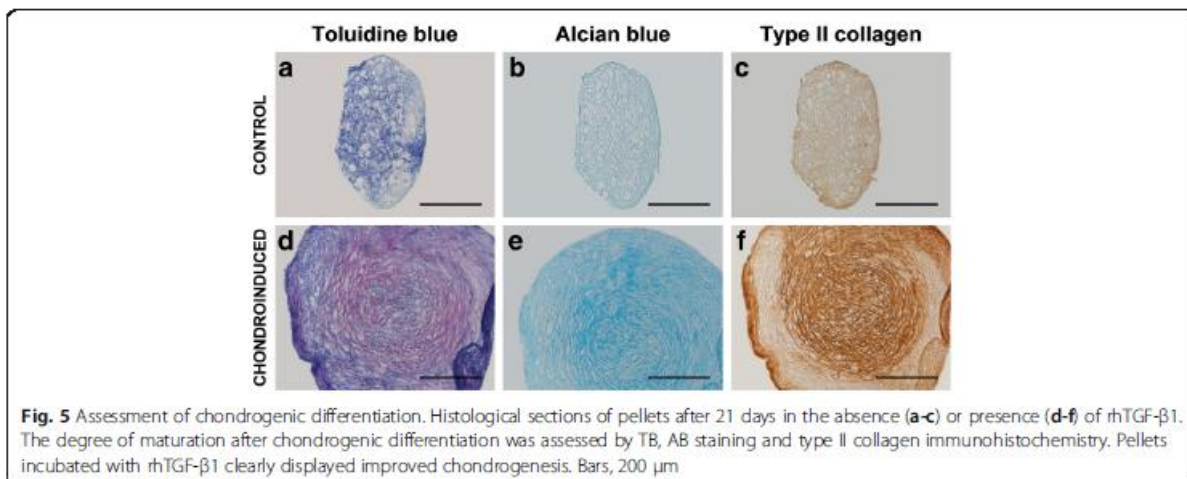
**Fig. 3** Cell morphology, proliferation and representative FACS analysis of fAd-MSCs for several mesenchymal and hematopoietic markers. **a** In primary cultures, a large number of adherent cells with fibroblastic morphology and colony-forming units were observed two days after initial seeding. **b** On secondary cultures, fAd-MSCs appeared as spindle-shaped cells that grown in a monolayer. **c** Representative curve obtained with MTS cell proliferation assay at passage 2. Cells started proliferating immediately after being plated, initiating the logarithmic growth phase and reaching its plateau phase around 21 days. **d** The immunophenotype profiles revealed a homogeneous cell population, characterized by the strong positive expression of CD29, CD44, CD73, CD90 and major histocompatibility class I (MHC-I), and lack expression of CD34, CD45 and MHC-II. As well, a minor population of STRO-1-expressing cells was observed. Bars, 200  $\mu$ m.

#### 《分化能》

- ・脂肪組織：分化誘導培地で 21 日培養後、オイルレッド O で赤く染色された (Fig.4-a-f)。
- ・骨細胞：高い ALP 活性 (Fig.4-g-h) およびアリザリンレッド S 染色 (Fig.4-i-j) された。
- ・ALP 活性はコントロール群と比較すると有意に高いレベルを示した (Fig4.-k)。
- ※ALP：骨代謝における中心的な役割を果たす酵素、石灰化に重要な役割。
- ・さらに顕著なカルシウム沈着も認められた (Table.3)
- ・軟骨細胞：rhTGF- $\beta$ 1 (※増殖・分化誘導因子) と一緒にインキュベートされたペレットは軟骨細胞に特徴的な形態を示した。
- ・TB (トルイジンブルー染色) と AB (アルシアンブルー染色) で高い親和性がみられた (Fig.5-a,b)。
- ・免疫染色では、軟骨特異的 II 型コラーゲンの沈着を認めた (Fig.5-c)

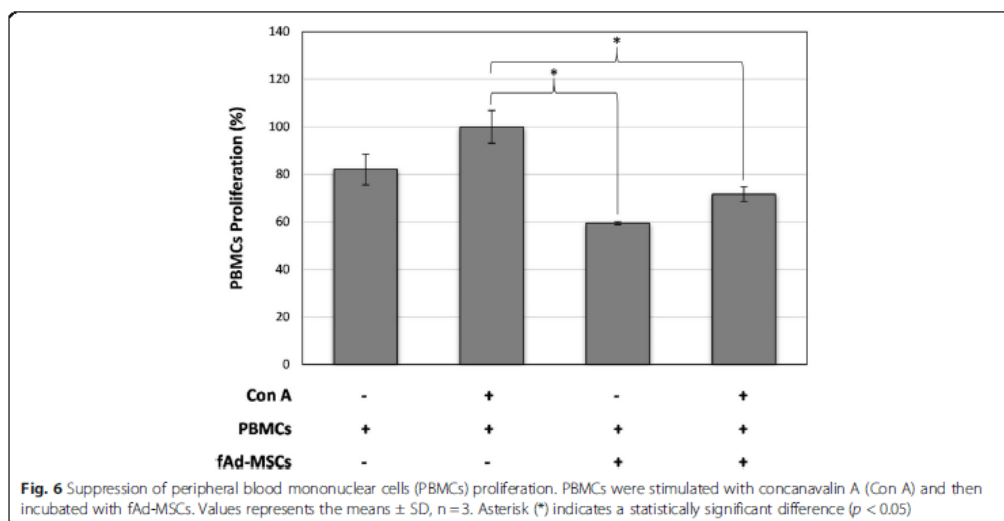


**Fig. 4** Assessment of adipogenic (a-f) and osteogenic (g-k) differentiation. Control (a-c) and adipo-induced (d-f) cultures at 7, 14 and 21 days. Positive Oil Red O staining confirmed the presence of lipid droplets only in adipogenic-induced cells. Bars, 200  $\mu$ m. Inserts represent higher magnification of the specific stain. Histochemical localization of ALP (g-h) and Alizarin Red S (i-j) staining at day 21. Osteoinduced cells formed numerous nodules highly positive for ALP staining. Control cells remained Alizarin Red S negative by day 21 whereas red calcium nodules clearly appeared on the osteoinduced cultures. **k** Quantitative measurement of ALP activity at 7, 14 and 21 days. Osteoinduced cells exhibited significantly higher levels of ALP activity ( $p < 0.001$ ) compared with the controls. Values represent the means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Asterisk (\*) indicates a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) for the same condition at different time points, whereas (●) represents  $p < 0.001$  between two groups at the same time period. Bars, 200  $\mu$ m



《免疫調整能》

・PMBCs 増殖をフローサイトメトリーで測定：fAd-MSCs と PMBCs を 72 時間共培養した群で有意に PMBCs の減少がみられた (Fig.6)



《Clinical signs》

- ・1 回目投与後：2/5 で眼の症状が改善した (Fig.7-a,b)
- ・1 回目投与の 4 週間後には角膜プラークや角膜血管新生、充血の減少がみられた (Fig.7-a)。
- ・この 2 症例は 2 か月目のフォローアップでの角膜細胞診で好酸球や肥満細胞が陰性であった。
- ・残りは 6 ヶ月の時点で臨床症状と細胞診の完全寛解が認められた。
- ・この回復はフォローアップ期間において悪化の兆候は示さなかった (Fig.7)
- ・また、フォローアップ期間中、局所的および全身的な合併症はみられなかった。
- ・血液検査および血清学的検査でも著変はみられなかった。
- ・眼検査：投与前、投与後共に著変なし。



**Fig. 7** Follow-up eye images in five cats (a-e) with chronic eosinophilic keratitis. Animals showed a complete remission of clinical signs at 6 months and this recovery remained stable until the last follow-up at 11 months.



《まとめ》

- ・本研究は FEK に対して他家 fAd-MSCs を投与した最初の臨床試験である。
- ・本研究に用いた猫は健康な猫の角膜からは検出されない好酸球と肥満細胞が全ての症例でみられた。
- ・また、FEK と FHV-1 との関連も示唆された。
- ・現在、FEK に対する標準的な治療は抗炎症剤や免疫抑制剤であるが、これらの薬剤は長期の服用による副作用が認められる。
- ・FEK は慢性的な疾患の為、治癒が難しく薬剤によるコントロールも服用を中止すると再発する。
- ・そのため、安全かつ効果的な治療が必要である。
- ・本研究では、全ての個体で臨床症状の回復がみられ、角膜増生や血管新生も投与後 1 週目から漸進的な減少が認められた。
- ・この回復はフォローアップ終了まで安定して続き、悪化の兆候もみられなかった。
- ・また、全ての個体でフォローアップ終了時までには好酸球と肥満細胞も検出されなくなった。
- ・さらに、全ての個体で局所的または全身的な合併症はみられなかった。
- ・FEK に対して fAd-MSCs の抗炎症と免疫調整の作用が働いていると考えられる。
- ・本研究の結果は従来の FEK 治療に対して応答しなかった猫に対して、fAd-MSCs 投与が安全かつ効果的であることを示唆した。
- ・FEK に対して、他家 fAd-MSCs 投与が安全で効果的で比較的簡便な治療であり、少なくとも 11 カ月は角膜表面の有意な改善を示すことを示唆した。