

～猫の難治性口内炎（FCGS）に対して他家 ADSC を投与した際の 安全性有効性評価～

Therapeutic Efficacy of Fresh, Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Feline Chronic Gingivostomatitis

BOAZ ARZI et al. (2017) *Stem cells translational medicine*

«Intro»

- ・以前、猫の慢性歯肉口内炎(FCGS)に自家の脂肪幹細胞(ADSC)を投与した研究では 71%で改善が認められた。
- ・今回の研究では、他家 ADSC の難治性 FCGS への効果を検討する。

«Study Population»

- ・全ての飼い主はインフォームドコンセントにサイン。
- ・6 か月以上前に完全抜歯しても反応がなかった難治性の FCGS をエンロール。
- ・試験開始 2 週間前から試験終了までステロイドおよび免疫抑制剤を投与せず。
- ・FIV / FeLV (－)
- ・7 匹がエンロール

«Study Design»

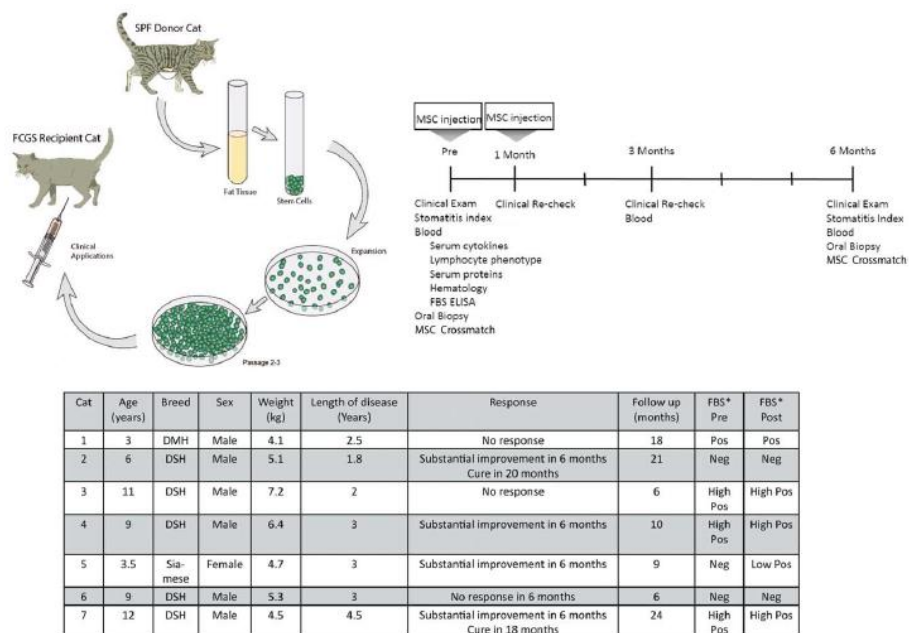


Figure 1. Study design layout and clinical outcome in cats receiving ASC therapy for FCGS. Images demonstrating the study design (A) and timeline (B) as well as the signalment and clinical data (C) for seven cats affected by FCGS enrolled in the clinical trial. Abbreviations: DMH, domestic medium hair; DSH, domestic short hair; FBS, fetal bovine serum; FCGS, feline chronic gingivostomatitis; SPF, specific pathogen free.

「ADSC」

- 3 匹の SPF 猫から脂肪を採取し、ADSC 培養。
- P2-P3 を試験に供試。
- 表現型をフローサイト解析：MHC- II、CD18、CD90、CD105
- 20×10^6 cells/cat を 2 回投与（1 回目投与の 1 か月後に 2 回目投与）。
- ADSC は 20-30 分かけて静脈投与。

「評価項目」

- SDAI：飼い主評価と 2 名の専門医による評価をスコア化（数値が低いほど良好）
- 免疫組織学：HE 染色、抗 CD3、抗 CD20 染色（パラフィン包埋し、 $0.4\mu\text{m}$ の厚さで観察）
- 血液検査：CBC、血清生化学、リンパ球表現型(CD4、CD8 α 、CD21)、血清サイトカイン(IFN- γ 、TNF- α 、IL-6)、抗 BSA 力価
- ADSC 体内動態：Tc-HMPAO でラベリングした ADSC を投与直後(T0)、投与 1/6/24(それぞれ T1,T6,T24) 時間後に Tracking

「結果」

- ADSC：CD105,90(+), MHC- II,CD18(-) (Fig.2)

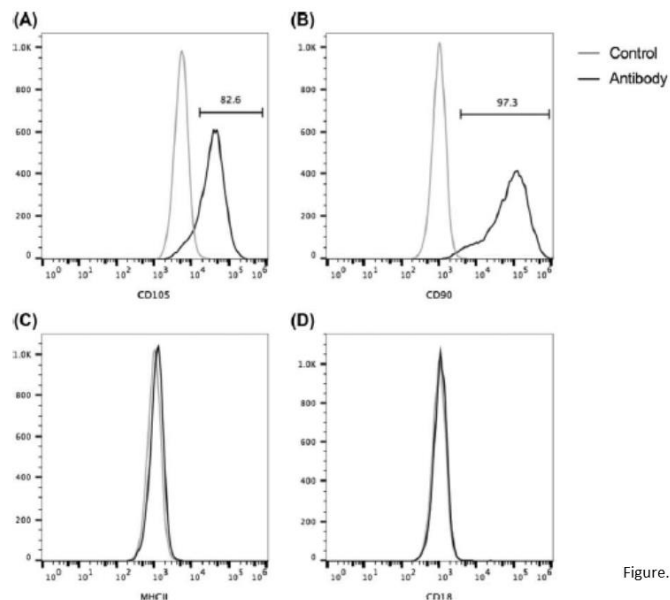
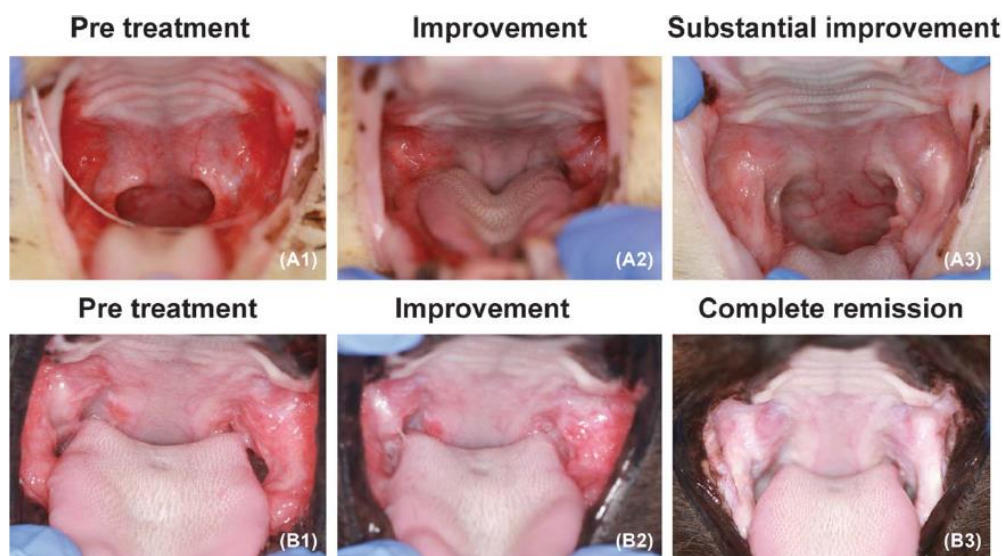


Figure.2

- CBC、血清生化学検査では著変なし。
- SDAI：Fig.3(C),(D)
- 6 か月後、7 匹中 4 匹（57%）で臨床的回復が認められた。うち 2 匹は投与後 18-20 カ月で完全に回復した。

- ・回復が認められた猫では食欲増進、体重増加、グルーミングがみられた。
- ・3匹では SDAI の変化がみえず、活動性の変化もなかった。



(C) **Stomatitis index**

Cat #	Entry	6 month	LR	% Recovery at Exit
1	25.5	25.5	25.5	0
2	18.75	9.25	0	100
3	21	16	-	23.8
4	16.75	2	-	93.4
5	11.25	2	-	91.1
6	17	14.5	-	14.7
7	17.75	8.12	0	100

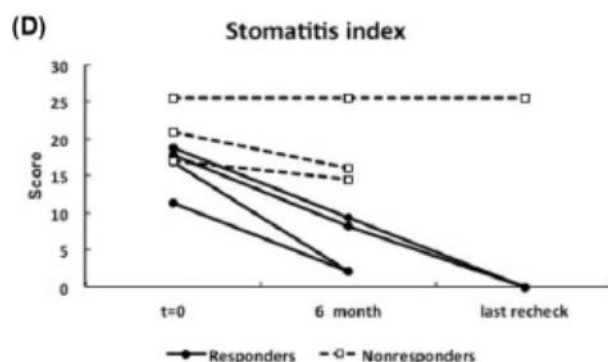


Figure.3

- ・口腔病変バイオプシー：ADSC 投与前後で免疫組織学的に比較。(Fig.4)
- ・投与前(Pre)
 - ・上皮や上皮下組織間質に炎症細胞（リンパ球、形質細胞、好中球、Mott 細胞、肥満細胞、組織球）の浸潤がみられる。
 - ・CD3 + T-cell：上皮や上皮下組織間質に存在。
 - ・CD20 + B-cell：上皮のみに存在。
- ・試験終了時
 - ・完全回復およびかなりの回復がみられた猫では、通常の組織構造が認められた。CD3 + T-cell、CD20 + B-cell は少数のみ確認された。(Fig.4 左および中央)
 - ・回復がみられなかった猫では、変わらずにリンパ形質細胞や好中球の浸潤がみられた。CD3 + T-cell、CD20 + B-cell も投与前と同様に高密度で存在。(Fig.4 右)

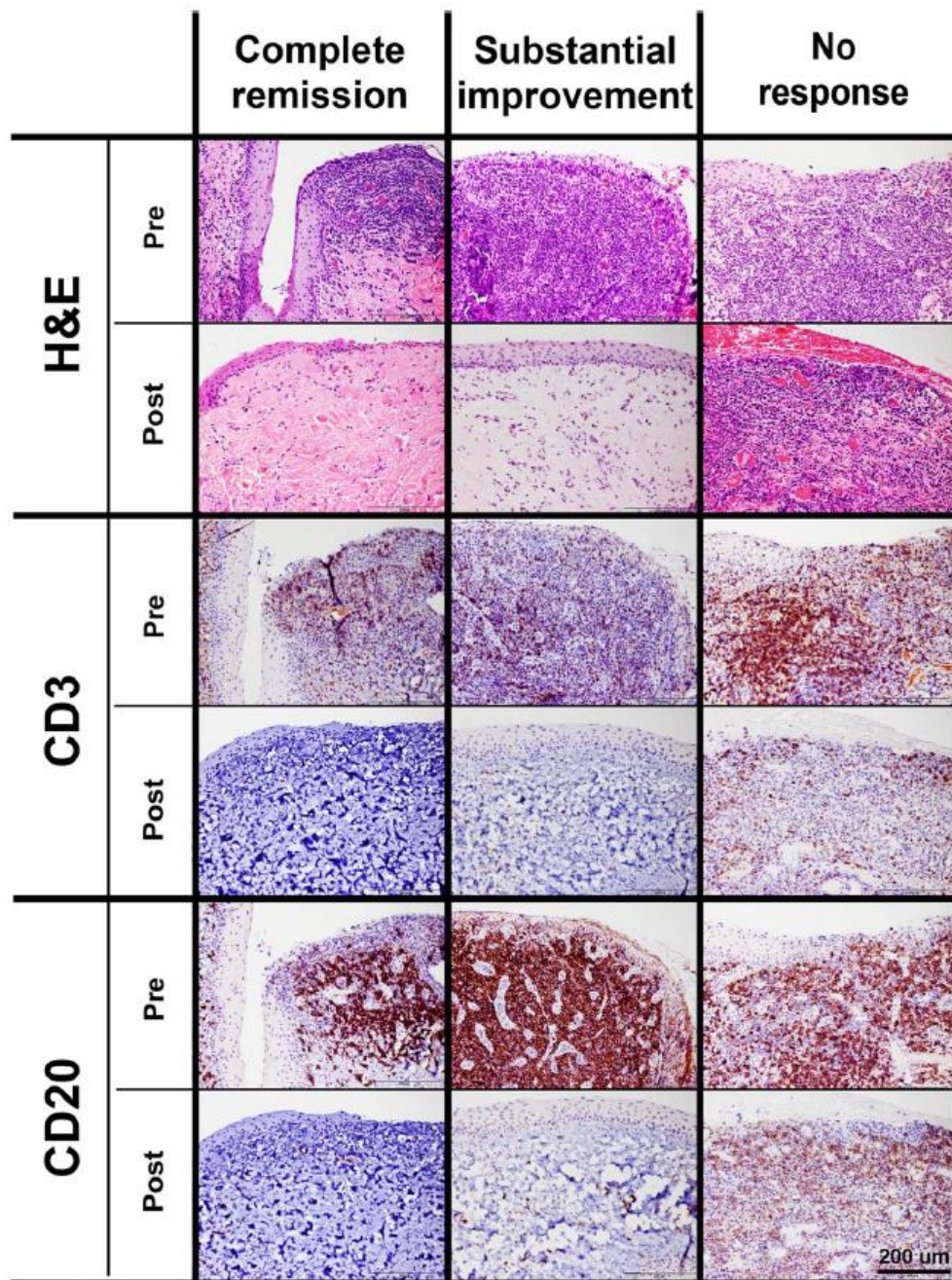


Figure 4. Histology of all pretreatment biopsies demonstrated that the epithelium and subepithelial stroma were expanded by a mixed inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, plasma cells, and neutrophils. The surface epithelium was frequently ulcerated and hyperplastic with multiple rete pegs extending into the subjacent stroma. Immunohistochemistry demonstrated that CD3+ T cells were present mostly within the epithelium and subepithelial stroma, while CD20+ B cells were mostly restricted to the subepithelial stroma. A return to normal tissue architecture was observed in biopsies of cats with complete clinical remission and substantial clinical improvement. However, occasional lymphocytes were observed within subepithelial stroma with no evidence of epithelial hyperplasia, ulceration, or inflammation. The post treatment biopsies from the cats with no clinical improvement were similar to the pretreatment biopsies.

- ・リンパ球サブセット (Fig.5A,B,C,D 網掛けが正常値)
 - ・投与前：CD4 + T-cell⇒正常値、CD8 + T-cell⇒増加、CD4/CD8⇒減少、CD8^{lo}⇒減少 (FCGSに自家 ADSC を投与した前回の試験と同様)
 - ・投与後：いずれのサブセットにおいても著変なし。回復がみられた 4 症例中 2 症例のみで CD8^{lo} の増加がみられた。(FCGS に自家 ADSC を投与した前回の試験では、回復症例全てで CD8^{lo} の増加がみられた。)
- ・ADSC 投与前から好中球増多症や高ガンマグロブリン血症がみられた症例は投与後も変わらず高値を示していた。(Fig.5E,F)

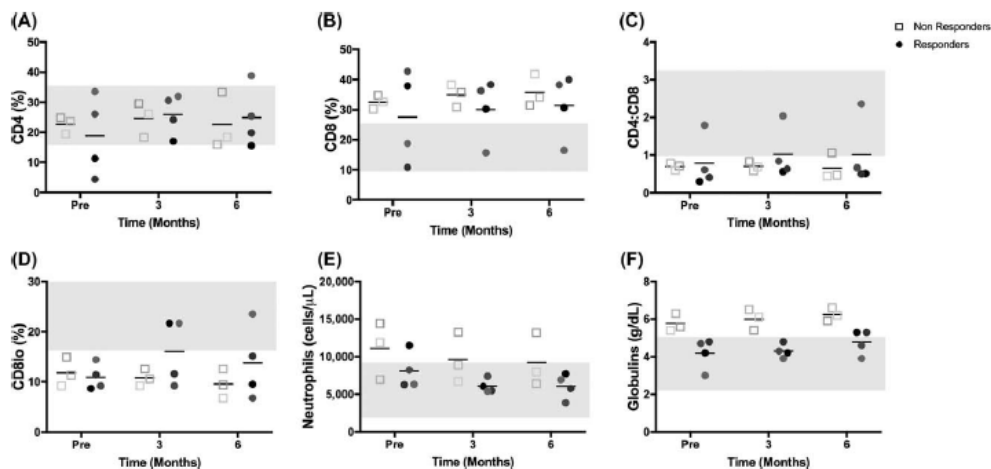


Figure 5. Circulating inflammatory cells and serum immunoglobulins. Flow cytometric analysis of whole blood for percent CD4+ T cells (A), percent CD8+ T cells (B), calculated ratio of CD4/CD8 T cells (C), and percent CD8^{lo} cells (D). Neutrophil number (E, from a complete blood count) and serum globulin concentration (F, from serum biochemistry panel). Plain gray bars represent either the range of values of control cats (A–D), which were used for parameters that did not have standard reference intervals, or the standard reference intervals obtained from University of California, Davis, School of Veterinary Medicine reference intervals (E, F). Abbreviation: Pre, before treatment.

- ・回復がみられなかった症例では回復がみられた症例に比べて、血清 IFN- γ が高値を示した。(Fig.6A)
- ・炎症性サイトカインである IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 は ADSC 投与による大きな変化はみられなかったが回復がみられた 1 症例のみで IFN- γ と TNF- α の増加がみられた。(Fig.6A,B)
- ・回復がみられなかった症例で投与 3 か月後に IFN- γ の減少がみられたが臨床症状とは関連がなかった。(Fig.6A)
- ・回復がみられなかった 1 症例のみで IL-6 の増加がみられた。(Fig.6C)

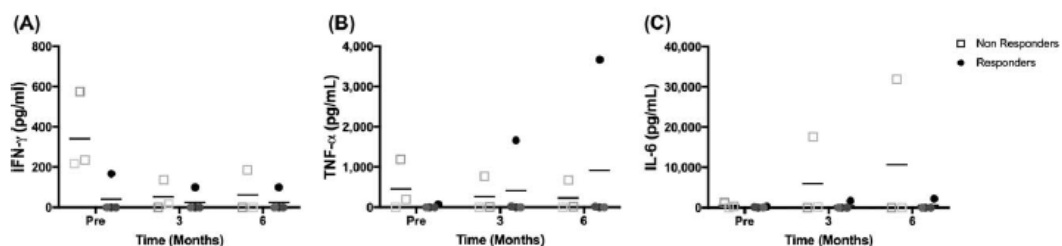


Figure 6. Circulating cytokines in FCGS affected cats before and after ASC therapy. Enzyme-linked immunosorbent assay results for serum concentrations of TNF- α (A), IFN- γ (B), and IL-6 (C) over time. Note that nonresponder cats tended to have higher concentration of IFN γ prior to treatment. Abbreviations: IFN, interferon; IL, interleukin; Pre, before treatment; TNF, tumor necrosis factor.

- 抗 BSA 力価は 6/7 の猫で ADSC 投与前後で変化がなかった。
- 抗 BSA 力価の変化があった猫（陰性から陽性）は臨床的改善がみられたが、ADSC 投与に関する相関は認められなかった。(Fig.1C)

- ADSC 投与直後は肺に局限していた。(Fig.7A,B,矢頭)
- low level ではあるが口腔を含む全身にADSCが散在しているのも確認された。(Fig.7A,B,矢印)
- FCGS 猫 (Fig.7B) は SPF 猫 (Fig.7A) に比べ、口腔へのADSC発現が多くみられた。
- ADSC の頭部／全身比はコントロールに比べて FCGS 猫の方で高値だった。(Fig.7C)

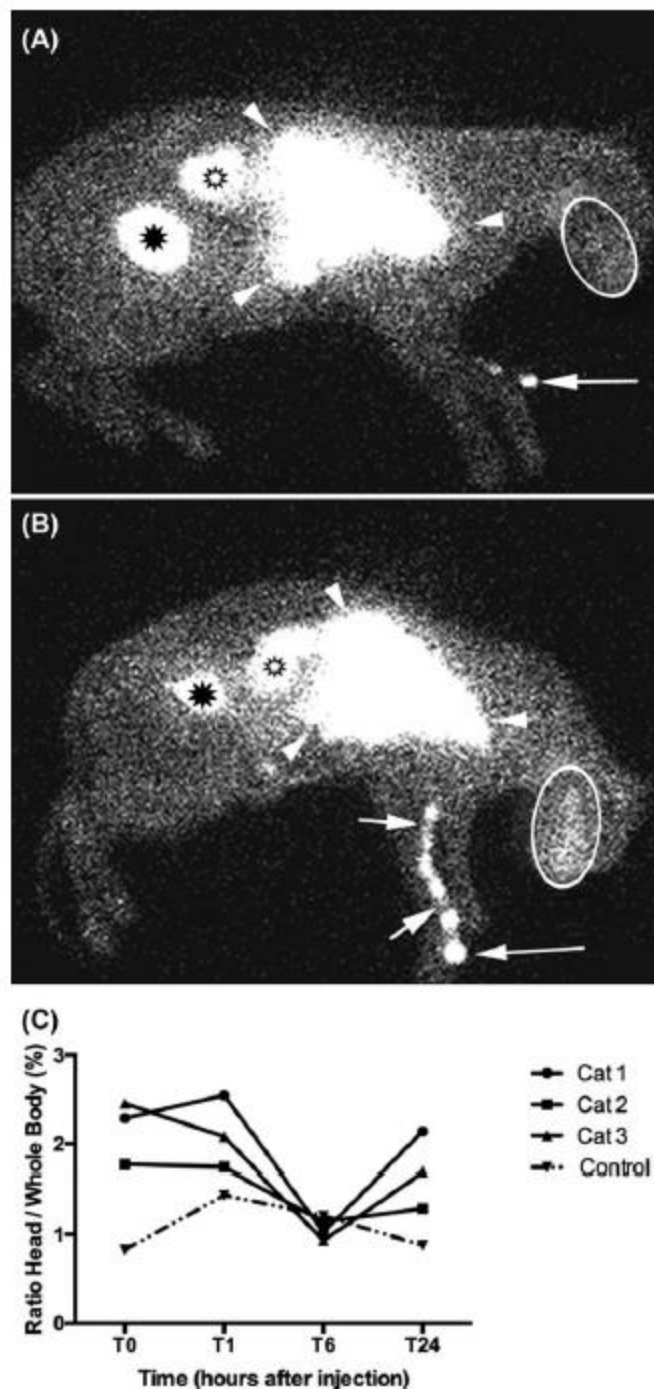


Figure 7. ASC tracking in FCGS affected cats vs. a control cat. Right lateral scintigraphic images obtained 1 hour post radiolabeled mesenchymal stem cells (MSC) injection in a control cat (A) and an feline chronic gingivostomatitis (FCGS) affected cat (B). Most of the radioactive signal was present within the lungs, likely due to trapping of the MSCs in the capillary bed. Marked radioactive uptake is also present in the kidneys and bladder, likely due to the presence of dissociated label. Additionally, the affected cat appears to have higher radioactive uptake in the region of the oral cavity as compared to the control cat. Focal radioactive uptake is also present in the area of the injected cephalic vein in the FCGS affected cat. The only uptake associated with the thoracic limb in the control cat is within the catheter and injection port. Line graph (C) demonstrates the ratio head/whole body at the different time points for all four cats.

«まとめ»

- ・他家 ADSC 投与に際し、副作用はみられなかった。
- ・FCGS に対して自家 ADSC を投与した回復率（71％）に比べて、他家 ADSC 投与した場合は回復率が低かった（57％）。
- ・臨床的回復期間も自家 ADSC（3-9 カ月）に比べて、他家 ADSC（12-20 カ月）と長期間要した。
- ・自家と他家の回復反応の差は FCGS のような痛みを生じる疾患にとって考慮しなければならない点かもしれない。