

犬の肝硬変に対する脱分化脂肪細胞の臨床応用に
向けた研究

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士過程

佐藤 慶太

2022

目次

| | |
|--|----|
| 序文 | 1 |
| 第1章 臨床応用に向けた脂肪組織の採材部位および犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) の作製の検討 | |
| 第1節 進行した慢性肝炎の犬における脂肪組織分布の解析 | 8 |
| 1.1.1 緒言 | 9 |
| 1.1.2 材料および方法 | 10 |
| 1.1.3 結果 | 12 |
| 1.1.4 考察 | 13 |
| 1.1.5 小括 | 15 |
| 第2節 腹腔鏡を用いた腹腔内脂肪組織の採取と犬 DFAT の作製 | 20 |
| 1.2.1 緒言 | 21 |
| 1.2.2 材料および方法 | 22 |
| 1.2.3 結果 | 24 |
| 1.2.4 考察 | 25 |
| 1.2.5 小括 | 28 |

第2章 他家犬 DFAT の投与に向けた主要組織適合性複合体 (MHC) の検討

第1節 犬 DFAT の MHC 遺伝子発現の解析 34

2.1.1 緒言 35

2.1.2 材料および方法 36

2.1.3 結果 38

2.1.4 考察 39

2.1.5 小括 43

第2節 MHC 遺伝子マッチングの有用性 47

2.2.1 緒言 48

2.2.2 材料および方法 49

2.2.3 結果 52

2.2.4 考察 54

2.2.5 小括 58

第3章 臨床応用に向けた犬 DFAT の調整と投与安全性の検討

第1節 細胞療法のための犬 DFAT の調整 68

3.1.1 緒言 69

3.1.2 材料および方法 70

3.1.3 結果 72

3.1.4 考察 73

3.1.5 小括 76

| | |
|-----------------------------|-----|
| 第2節 犬 DFAT の末梢静脈および門脈投与の安全性 | 79 |
| 3.2.1 緒言 | 80 |
| 3.2.2 材料および方法 | 81 |
| 3.2.3 結果 | 86 |
| 3.2.4 考察 | 87 |
| 3.2.5 小括 | 92 |
| 第4章 総括 | 96 |
| 謝辞 | 99 |
| 引用文献 | 100 |

序文

犬の慢性肝炎は肝細胞の壊死もしくはアポトーシスとリンパ球を中心とした炎症細胞の浸潤によって定義づけられ、持続的な肝細胞の再生と線維化を繰り返し、その終末像である肝硬変へと至る (van den Ingh et al., 2006; Webster et al., 2019)。犬の慢性肝炎は微生物、毒物、薬剤、自己免疫性、犬種関連性などの関与が示唆されているが、その多くが原因を特定することが困難であるため特発性慢性肝炎と診断される (van den Ingh et al., 2006; Webster et al., 2019)。慢性肝炎はその進行により機能的な肝細胞数の減少による肝機能の低下と肝線維化に伴い門脈圧が亢進し、黄疸や低アルブミン血症、血液凝固機能障害、肝性脳症、腹水などを呈する (Webster et al., 2019)。慢性肝炎の治療は、1988年に Strombeck らにより生存期間が延長することが示されて以降、グルココルチコイドを中心とした治療が行われてきた (Strombeck et al., 1988)。また、より厳格な診断基準に基づき銅関連性肝炎を除外し、グルココルチコイドの効果を再検証した報告においても炎症および線維化の改善が認められ、生存期間を延長する (Favier et al., 2013)。さらに、近年では免疫抑制剤であるシクロスポリンが一定の効果を示すことが示唆されている (Ullal et al., 2019)。一方、慢性肝炎の終末像である肝硬変に至った場合にはグルココルチコイドに対する反応性が悪く、予後が1ヶ月程度と極めて短い (Favier et al., 2013)。また、シクロスポリンは重篤な肝炎に対する有効性が検証されていない (Ullal et al., 2019)。したがって、現状で犬の肝硬変に対する有効な治療法はなく、既存の治療に代わる新規治療法の模索が急務である。

医学領域において肝硬変に対する最も有効な治療法は生体肝移植に限

られる。生体肝移植にはドナー確保や手術合併症、高額な治療費、免疫抑制剤の長期投与の必要性など多くの制限が存在することから、生体肝移植に代わる新規治療法として細胞療法に関心が高まっている(Suk et al., 2016; Liang et al., 2017)。細胞療法のソースとしてこれまでに肝細胞や人工多能性幹細胞などが検討されているが、肝細胞移植には安定した培養法が確立されておらず、移植細胞の定着性が低いことやドナー不足が問題点として挙げられる(Forbes et al., 2015)。近年、類人猿肝硬変モデルに対して人工多能性幹細胞由来の肝細胞様細胞移植が有用であることが示されたが、人工多能性幹細胞は腫瘍形成のリスクを持つことから現時点で臨床応用に至っていない(Malchenko et al., 2014; Yasuda et al., 2020)。

一方、骨髄や脂肪組織に由来する間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)は多分化能をもつ体性幹細胞であり、採取が簡便でありながら免疫調整作用や抗線維化作用を有することから種々の疾患に対する新規治療法として期待されている。MSCはB細胞およびT細胞の増殖と機能を直接阻害し、一酸化窒素、プロスタグランジンE₂、TGF- β およびIL-10などの免疫調節因子を分泌することで炎症反応の抑制に寄与する(Chow et al., 2017; Fang et al., 2018 b)。また、肝細胞増殖因子や血管内皮増殖因子といった栄養因子を放出することにより、肝組織の再生や修復に寄与する(Li et al., 2013; Bahamondes et al., 2017; Chow et al., 2017)。さらに、マトリックスメタプロテアーゼの発現を上昇させるとともに肝星細胞の増殖や活性化を抑制することにより肝臓の線維化を抑制する(Wang et al., 2009; Rabani et al., 2010; Li et al., 2013)。これらの特性は肝硬

変治療に対して有用性が高く、人を対象とした臨床研究から肝機能や臨床スコアなどの改善が認められている(Suk et al., 2016; Liang et al., 2017; Fang et al., 2018 b)。

これまでに人の肝硬変を対象とした臨床研究の多くで骨髄由来 MSC を使用しているが、近年では骨髄採取の侵襲性が問題視されており、より低侵襲に採取できる脂肪組織由来間葉系幹細胞 (Adipose tissue derived stem cell : ASC) が注目を集めている。また、単回投与では改善効果が短期的であり、長期の治療効果を得るためには複数回の投与が必要となる。このことから、迅速に多量の細胞を確保するために他家由来 MSC の安全性に関する検討が行われている。したがって、人の肝硬変に対する MSC 療法は一般に低侵襲に多量の細胞数を確保することが課題とされている(Cao et al., 2020; Tao et al., 2020)。

近年、獣医学領域においても細胞療法への関心が高まっており、骨格筋疾患や神経疾患を中心に多数の疾患を治療対象とした研究がなされている(Gugjoo et al., 2019; Voga et al., 2020)。一方、犬の肝障害を対象とした研究は少ない。CCl₄を用いた犬急性肝障害および肝線維症モデルを使用した研究では、CCl₄投与に伴う臨床症状や血液生化学的所見の改善に加え、病理組織学的に炎症や線維化の改善が認められた(Matsuda et al., 2017; Teshima et al., 2017; Fang et al., 2018 a; Nishimura et al., 2019; Yan et al., 2019)。また、肝疾患症例においても臨床症状や肝酵素値の改善が認められた(Nam et al., 2017; Gardin et al., 2018)。犬の肝障害に対する MSC 療法は人と同様に骨髄由来および脂肪由来が

使用されているが、多くの研究において低侵襲に採取が可能であることから ASC を使用している (Nam et al., 2017; Teshima et al., 2017; Fang et al., 2018 a; Gardin et al., 2018; Yan et al., 2019)。臨床例に対しては複数回の投与が行われており、肝皮膚症候群の症例報告では数十回の投与により長期的に良好な経過を示した (Nam et al., 2017)。この症例では自家由来 ASC が適応とならず他家由来 ASC を使用しており、長期的な肝障害の管理には他家移植を含めた多量の治療用細胞数を確保する必要がある。したがって、犬の肝硬変に対する細胞療法は人と同様に低侵襲に多量の治療用細胞を確保することが課題であり、他家移植に対する検討が必要である。

脂肪組織は生体中に多量に存在し、低侵襲に採取することが可能であることから ASC が骨髄由来 MSC と比較して有用性が高い (Bahamondes et al., 2017)。一方、ASC は脂肪吸引などによる多量の脂肪組織を由来とすることから、栄養状態が悪く脂肪組織量が少ないことが予想される肝硬変の犬では十分量の組織が採取できない可能性がある。Kano、Matsumoto らは成熟脂肪細胞を天井培養することで得られる線維芽細胞様の細胞が、高い増殖活性と MSC に類似した多分化能を有することを明らかにし、これを脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cells: DFAT cells) と名付けた (Matsumoto et al., 2008)。DFAT と ASC はともに脂肪組織をコラゲナーゼ処理することにより得られるが、ASC が処理の過程で沈澱した少量の間質血管系分画を由来とするのに対し、DFAT は浮遊した多量の成熟脂肪細胞を由来とする (Fig. 1)。間質血管系分画は幹細胞のほか、血管内皮細胞や平滑筋細胞などの異種細胞の混合物であり、幹

細胞を抽出するために継代を繰り返す必要がある (Matsumoto et al., 2008; Kono et al., 2014; Gardin et al., 2018)。一方、DFAT は成熟脂肪細胞のみを起源とすることから均質な細胞集団であり、安全性と有効性が高い (Matsumoto et al., 2008)。また、脂肪組織中に存在する多量の成熟脂肪細胞を由来とすることから少量の脂肪組織から作製可能であり、ASC と比較して作製効率が高い (Kono et al., 2014)。さらに、ASC の作製過程で破棄される細胞を使用することから、組織検体の有効活用が可能であり、必要に応じて ASC と DFAT を同時に作製することも可能である (Kono et al., 2014)。DFAT は ASC と類似した免疫調整作用や血管新生作用、多分化能を有することから、種々の疾患モデルの治療に寄与することが示されている (Jumabay et al., 2009; Sakuma et al., 2009; Nakayama et al., 2017; Ishioka et al., 2020)。したがって、DFAT は低侵襲に多量の細胞を調整でき、肝硬変の犬に対する新しい細胞療法のソースとして期待できる。DFAT は多くの動物種で作製可能であることが示されているが、犬 DFAT に関する報告は少なく、他家移植を含めた臨床応用に関わる基礎的な知見が得られていない。

以上のことから、犬の DFAT を肝硬変に対する新規治療法として臨床応用することを目標に、第 1 章では脂肪組織の採材部位および犬 DFAT の作製について検討し、第 2 章で他家犬 DFAT の投与に向けた主要組織適合性複合体 (Major histocompatibility complex : MHC) について検討し、第 3 章で犬 DFAT の調整と投与安全性について検討した。

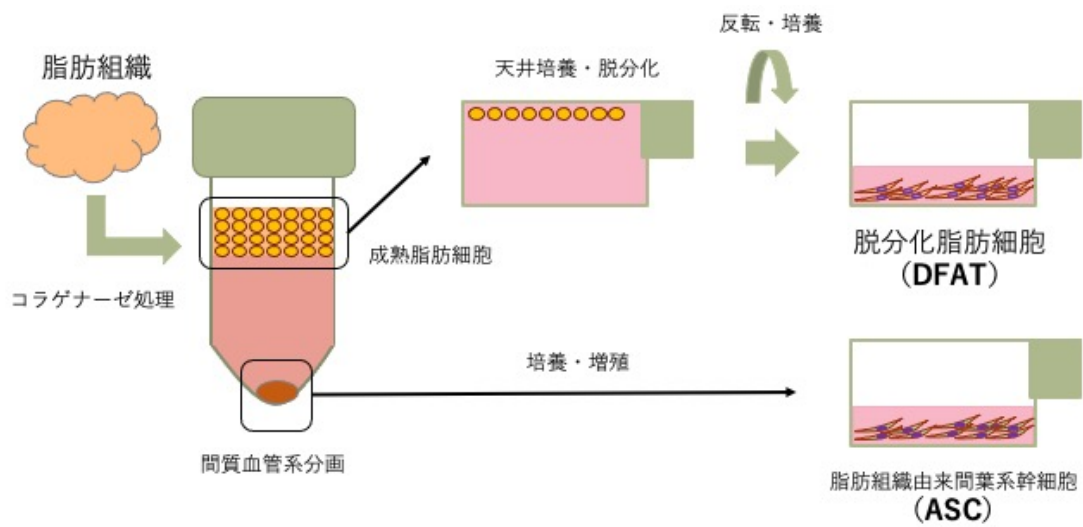


Fig. 1 脱分化脂肪細胞（DFAT）と脂肪組織由来間葉系幹細胞（ASC）の作製様式

DFAT は脂肪組織のコラゲナーゼ処理の過程で浮遊した成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られるが、ASC は沈澱した間質血管系分画を由来とする。

第1章 臨床応用に向けた脂肪組織の採材部位および 犬脱分化脂肪細胞（DFAT）の作製の検討

第1節 進行した慢性肝炎の犬における脂肪組織分布の解析

1. 緒言

慢性肝炎は犬で一般的な肝疾患であり、その終末像は肝硬変である。慢性肝炎は、その病態の進行に伴い機能的肝細胞数の減少による低アルブミン血症や重度の線維化に伴う門脈圧亢進症による後天性門脈体循環側副路が出現する (van den Ingh et al., 2006)。本疾患の確定診断や炎症、線維化の評価には肝生検が必須となるが、肝生検方法として腹腔鏡下肝生検は安全かつ十分量の採材が可能な方法である (van den Ingh et al., 2006; Kemp et al., 2015; Webster et al., 2019)。慢性肝炎の治療には生存日数を延長することが報告されているグルココルチコイドが使用されてきた (Strombeck et al., 1988)。しかし、グルココルチコイドの長期使用は副作用が問題となる。また、肝硬変に進行した犬ではグルココルチコイドの効果が乏しく、生存日数が短い (Favier et al., 2013)。したがって、進行した慢性肝炎の犬に対する新たな治療法が望まれる。

間葉系幹細胞 (MSC) は、脂肪組織や骨髄などに存在する体性幹細胞であり、高い増殖能と多分化能を有する (Kisiel et al., 2012; Chow et al., 2017)。MSC は炎症や線維化を抑制する作用があるため、人の肝硬変患者に対する細胞源として期待されており、多くの臨床研究が実施されている (Tao et al., 2020)。特に、脂肪組織由来 MSC が骨髄由来 MSC と比較して脂肪組織が低侵襲に十分量を採取できるため臨床に適している。そのため、犬では皮下脂肪組織から MSC を作製し、他家由来 MSC を細胞源とした細胞療法が実施されている (Olsen et al., 2019)。したがって、進行した犬の慢性肝炎に対して脂肪組織に由来する細胞療法を実施するためには低侵襲かつ安定した組織採取が望まれる。

細胞療法において他家由来細胞は拒絶反応が問題点として挙げられ、自家由来の細胞を使用することが理想的である。したがって、腹腔鏡下肝生検を実施する際に、脂肪組織を同時に採取することで、自家由来細胞療法の細胞源として利用できる可能性がある。しかし、進行した慢性肝炎の犬では低アルブミン血症を呈し、低栄養の状態から体脂肪組織量の減少が予想される。また、慢性肝炎の犬における皮下および腹腔内脂肪の組織分布についてこれまでに評価されていない。そこで本研究は、慢性肝炎の犬において皮下および腹腔内脂肪の組織分布を CT 画像により解析した。

2. 材料および方法

1) 対象

日本大学動物病院 (ANMEC) の消化器内科において慢性肝炎と診断した犬 25 頭を対象として調査した。また、造影 CT 検査で後天性門脈体循環側副路が出現している犬を慢性肝炎・進行群、出現していない犬を慢性肝炎・非進行群に分類し、これら 2 群の血漿アルブミン濃度を比較し肝機能および栄養状態の差を確認した。

2) CT 検査

全ての犬は全身麻酔下で腹臥位に保定後、マルチスライス CT (Canon Medical Systems Corp., Tochigi, Japan) によりボーラストラッキング法を用いて単純撮影後、三相造影を実施した (Sato et al., 2020 a)。なお、造影剤はイオヘキ

ソール (Teva Takeda Pharma Ltd., Tokyo, Japan) を 2.5 ml/kg の用量で使用した。単純 CT 画像は脂肪組織分布の解析に、造影 CT 画像は後天性門脈体循環側副路の評価に用いた。

3) 脂肪組織分布の解析

得られた単純 CT 画像 (Fig. 2.1.1) から犬の脂肪組織の分布を ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて解析した (Turner et al., 2020)。脂肪組織の抽出は犬において個体間の差が少なく、脂肪面積が脂肪体積と最も相関する第三腰椎レベルの CT 横断面像を使用した (Kobayashi et al., 2014; Nagao et al., 2019)。まず、第三腰椎レベルの単純 CT 横断面像から体表を関心領域 (ROI) で囲み全体面積を算出した。次に脂肪組織の CT 値である -250 から -25HU を抽出し、そのピクセル数から総脂肪面積を算出した。腹腔内脂肪面積は ROI にて腹腔内を囲むことで算出し、皮下脂肪面積は総脂肪面積から腹腔内脂肪面積を引いた面積とした。これらの得られた面積から、以下のパラメーターを算出した。

$$\text{皮下脂肪面積/全体面積比 (\%)} = \text{皮下脂肪面積} \div \text{全体面積} \times 100$$

$$\text{腹腔内脂肪面積/全体面積比 (\%)} = \text{腹腔内脂肪面積} \div \text{全体面積} \times 100$$

$$\text{腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比} = \text{腹腔内脂肪面積} \div \text{皮下脂肪面積}$$

4) 統計学的処理

すべての結果は中央値 (範囲) で表した。慢性肝炎・進行群と慢性肝炎・非進行群における皮下脂肪面積/全体面積比と腹腔内脂肪面積/全体面積比の比

較は Wilcoxon の符号順位検定を使用した。また、腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比と血漿アルブミン濃度の各群間における比較は Mann-Whitney U 検定を使用した。統計は GraphPad PRISM for Mac OS X version 5.0b にて解析し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

慢性肝炎 25 頭の造影 CT 画像から後天性門脈体循環側副路を評価した結果、後天性門脈体循環側副路が存在した慢性肝炎・進行群は 11 頭、後天性門脈体循環側副路が存在していなかった慢性肝炎・非進行群の犬は 14 頭であった。慢性肝炎・進行群の性別は雄 4 頭(うち去勢雄 1 頭)、雌 7 頭(うち避妊雌 5 頭)、年齢と体重の中央値はそれぞれ 8.4 歳 (3.6–12.2 歳)、8.3 kg (1.6–27.9 kg) であった。慢性肝炎・非進行群の性別は去勢雄 5 頭、雌 9 頭(うち避妊雌 8 頭)、年齢と体重の中央値はそれぞれ 5.2 歳 (2.1–11.2 歳)、14.2 kg (5.0–34.0 kg) であった。また、慢性肝炎・進行群の血漿アルブミン濃度は 2.1 g/dl (1.4–2.9 g/dl) と慢性肝炎・非進行群の 2.8 g/dl(2.2–3.2 g/dl) と比べて有意に低かった ($P=0.002$ 、Fig. 2.1.2)。

慢性肝炎・進行群における皮下脂肪面積/全体面積比と腹腔内脂肪面積/全体面積比の中央値はそれぞれ 17.0% (4.9–29.0%) と 24.1% (8.1–40.6%) であり、腹腔内脂肪面積/全体面積比が有意に高値を示した ($P=0.02$ 、Fig. 2.1.3 A)。一方、慢性肝炎・非進行群においては皮下脂肪面積/全体面積比と腹腔内脂肪面積/全体面積比に有意差は認められなかった ($P=0.06$ 、Fig. 2.1.3 B)。また、慢

性肝炎・進行群の腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比の中央値は 1.4 (0.8–2.6) であり、慢性肝炎・非進行群の 0.8 (0.4–1.5) と比較して有意に高値を示した ($P = 0.002$ 、Fig. 2.1.4)。

4. 考察

近年、獣医学領域の細胞療法の細胞源として用いられている MSC は、抗炎症作用や免疫調整作用などを有するため炎症性疾患の新規治療として期待されている (Gugjoo et al., 2019; Voga et al., 2020)。慢性肝炎は犬で一般的な炎症性肝疾患であり、肝硬変に進行した場合には既存の内科療法でのコントロールが困難である (Favier et al., 2013)。したがって、MSC を応用した肝硬変の新規治療法に期待が集まっている。医学領域では肝硬変患者に骨髄組織由来、脂肪組織由来 MSC を投与する臨床治験が開始されており、臨床スコアの改善などの効果が示されている (Suk et al., 2016; Liang et al., 2017; Fang et al., 2018 b)。一方、進行した慢性肝炎の犬に対し、MSC を用いた臨床治験はほとんど報告されていない。また、犬では骨髄組織より脂肪組織の採取が容易であるが、進行した慢性肝炎の犬では食欲不振のみならず低アルブミン血症や門脈圧亢進症による腹水貯留などから低栄養状態が予想される。したがって、一般的に MSC 作製に利用する皮下脂肪組織の採取量が少ない、または採取できない恐れがあった。今回、進行した慢性肝炎の犬に対して CT 画像による脂肪組織分布を解析したところ、皮下脂肪組織が腹腔内脂肪組織と比べて少ないことが明らかとなった。

造影 CT 検査は犬の先天性門脈体循環シャントを代表とする肝疾患の診

断に広く利用されている(Or et al., 2016)。また、単純 CT 検査では皮下脂肪および腹腔脂肪組織の量を正確に評価できるため、人の末期肝疾患患者の栄養状態モニターとしても応用されている(Bush et al., 2018)。犬においても脂肪組織分布の評価に CT の有用性が示されている(Turner et al., 2020)。したがって、本研究では慢性肝炎の犬 25 頭の単純 CT 画像から脂肪組織分布を ImageJ ソフトウェアにより解析した。その結果、すべての犬で皮下脂肪組織と腹腔内脂肪組織は容易に識別することが可能であった。

本研究では、慢性肝炎・進行群と慢性肝炎・非進行群は造影 CT 検査による後天性門脈体循環側副路の有無で分類した。一般に後天性門脈体循環側副路は門脈圧亢進症の存在を間接的に示す指標である。また、門脈圧亢進症の存在は、門脈血流抵抗を増大させる肝線維化の反映であり、慢性肝炎の進行を意味する。2 群間の血漿アルブミン濃度を確認したところ、慢性肝炎・進行群の犬が非進行群の犬の血漿アルブミン濃度より低下していた。したがって、本研究における慢性肝炎・進行群の犬は、細胞療法の適応となる重度に進行した慢性肝炎であり、低栄養状態であることが示唆された。

慢性肝炎・進行群の皮下脂肪面積/全体面積比と腹腔内脂肪面積/全体面積比を調べた結果、腹腔内脂肪面積比が有意に高値を示し、慢性肝炎・非進行群に差は認められなかった。一般に健常犬の皮下脂肪組織は腹腔内脂肪組織と比較して多く、腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比は 1.0 未満となる(Turner et al., 2020)。本研究では、慢性肝炎・進行群の犬 11 頭中 10 頭の腹腔内脂肪面積/皮

下脂肪面積比が 1.0 以上であった。健常犬では腹腔内脂肪組織は皮下脂肪組織に比べて栄養状態による影響を受けにくい(Kobayashi et al., 2014; Bahamondes et al., 2017)が、これまでに消瘦を伴う疾患の犬で安定的な脂肪分布を調査した研究はない。本研究から、栄養状態の悪い進行した慢性肝炎の犬では、腹腔内脂肪が安定的に存在することが明らかとなり、自家細胞療法用細胞の作製に腹腔内脂肪組織を利用することで十分量の脂肪組織を採取できることが明らかとなった。

慢性肝炎の確定診断には病理組織学的検査が必須であり、犬に対する侵襲や肝臓組織の採材量から腹腔鏡下鉗子生検が最も適している(Kemp et al., 2015)。また近年、犬 5 頭の腹腔鏡下卵巣摘出術や胃固定術、腹腔鏡下肝生検(正常な肝臓)の際に、組織細切除去装置を用いて採取した腹腔内脂肪組織から MSC を作製している(DePompeo et al., 2020)。したがって、慢性肝炎の診断と同時に脂肪組織の採取が可能であることが示唆された。

5. 小括

進行した慢性肝炎に罹患した犬は皮下脂肪と比較して腹腔内脂肪が安定的に採取できる可能性があり、腹腔鏡を利用した脂肪組織採取が可能であることが示唆された。

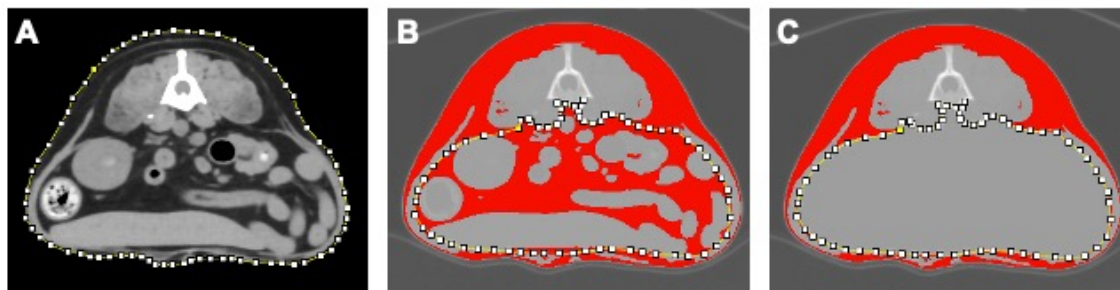


Fig. 2.1.1 ImageJ ソフトウェアを用いた犬の脂肪組織分析法

第三腰椎レベルの単純 CT 横断面像から関心領域 (ROI、黄色線) にて体表を囲み全体面積を算出した (A)。次に脂肪組織の CT 値 (-250 から -25 HU) から総脂肪面積 (赤色) を抽出し、腹腔内脂肪を ROI で囲み腹腔内脂肪面積を算出した (B)。さらに、総脂肪面積から腹腔内脂肪面積を切り抜き、皮下脂肪面積を算出した (C)。

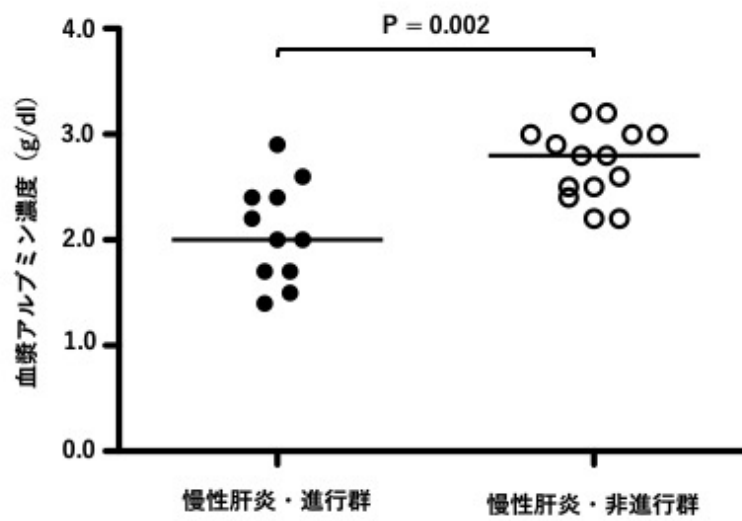


Fig. 2.1.2 慢性肝炎の進行群および非進行群における血漿アルブミン濃度

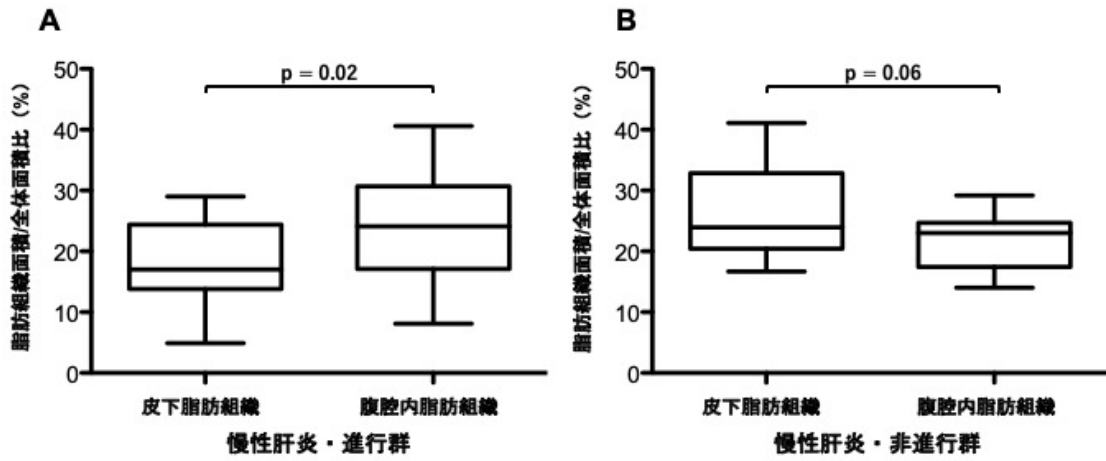


Fig. 2.1.3 慢性肝炎の進行群 (A) および非進行群 (B) における脂肪面積/全体面積比

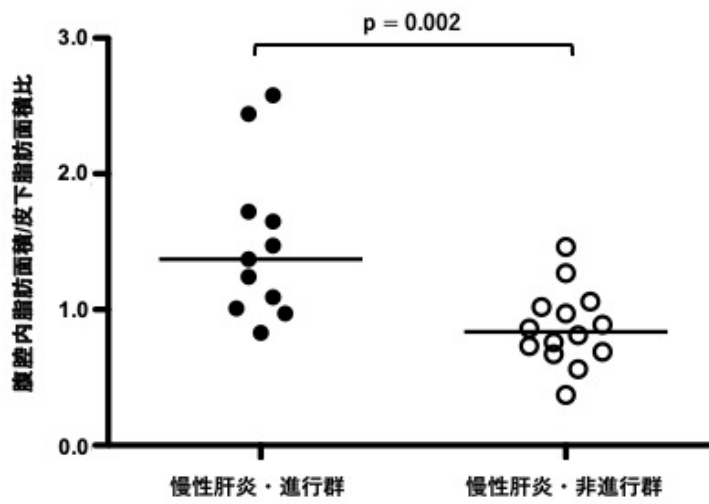


Fig. 2.1.4 慢性肝炎の進行群および非進行群における腹腔内脂肪面積/皮下脂肪面積比

第1章 臨床応用に向けた脂肪組織の採材部位および 犬脱分化脂肪細胞（DFAT）の作製の検討

第2節 腹腔鏡を用いた腹腔内脂肪組織の採取と犬 DFAT の作製

1. 緒言

慢性肝炎は犬の一般的な肝疾患であり、その終末像である肝硬変にいたった場合には有効な治療法はなく、極めて予後が短い(Favier et al., 2013)。したがって、間葉系幹細胞 (MSC) を中心とした細胞療法が新規治療法として期待され、低侵襲に採取が可能であることから脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC) が注目されている (Voga et al., 2020)。ASC の細胞源である脂肪組織は全身に分布しているが、主に皮下脂肪もしくは腹腔内脂肪が使用されている。皮下脂肪は開腹術などの侵襲の高い採取方法を必要としないが、腹腔内脂肪と比較して動物の状態により採取量に変動がみられる (Kobayashi et al., 2014; Bahamondes et al., 2017)。前節より進行し、栄養状態の悪い慢性肝炎の犬では皮下脂肪面積が腹腔内脂肪面積と比較して少ないことを CT 画像により明らかにした。したがって、腹腔内脂肪がより安定的に採取が可能であり、組織採取に適していることが明らかとなった。

ASC は骨髄由来 MSC と比較して低侵襲に採取が可能であることからこれまでの肝障害の犬に対して使用されてきた (Nam et al., 2017; Teshima et al., 2017; Fang et al., 2018 a; Gardin et al., 2018; Yan et al., 2019)。しかし、ASC の作製には多量の脂肪組織が必要であり (DePompeo et al., 2020)、栄養状態が悪く、脂肪組織量が少ない肝硬変患者を長期間管理するためには自家細胞が不足する可能性がある。脱分化脂肪細胞 (DFAT) は成熟脂肪細胞を由来とする線維芽細胞様細胞であり、ASC と類似した免疫調整作用などを有することから細胞療法のソースとして期待されている (Matsumoto et al., 2008; Ishioka et al.,

2020)。DFAT は ASC の作製過程で破棄される多量の成熟脂肪細胞を由来とすることから、少量の脂肪組織から作製可能であり、多量の脂肪組織を必要とする ASC の欠点を補うことができる可能性がある (Matsumoto et al., 2008)。しかし、犬 DFAT が少量の脂肪組織から作製可能であることを示した報告はない。

犬の肝硬変では確定診断のために肝生検による病理組織学的評価が必須となる。肝生検の手法は複数報告されているが、腹腔鏡検査による肝生検は低侵襲であり、かつ病理検査に必要十分量の組織が採取可能である (Kemp et al., 2015)。腹腔鏡検査では腹腔内脂肪が容易に目視可能であることから、肝生検の際に同時に脂肪組織を採取することで、DFAT 作製に必要な腹腔内脂肪を最小限の侵襲によって採取できる可能性がある。しかし、これまでに腹腔鏡により採取した脂肪組織より DFAT を作製した報告はない。

したがって、本節では腹腔鏡を応用し、低侵襲に採取した少量の脂肪組織から DFAT の作製を試みた。また、前節で収集した慢性肝炎の犬の腹腔鏡検査画像から腹腔内脂肪の分布を確認し、うち 1 例で脂肪組織の採取を試みた。

2. 材料および方法

1) 腹腔鏡下脂肪組織採取

供試動物として健常ビーグル 5 頭を使用した。使用した犬の年齢と体重の中央値はそれぞれ 3.4 歳 (範囲: 2.8–3.5 歳) と 12.1 kg (範囲: 10.6–14.4 kg) であった。また、すべての犬は血液検査、腹部超音波検査の結果に基づいて基礎

疾患がなく、健常であることを確認した。

腹腔鏡下脂肪組織の採取は全身麻酔下で実施した。全身麻酔はアトロピン塩酸塩 (0.04 mg/kg, S.C.) および酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) により前投与を行い、プロポフォール (7 mg/kg, I.V. to effect) により麻酔導入した。導入後、気管挿管を行い、イソフルランにより麻酔維持を行なった。術後鎮痛及び感染症対策として酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) およびセフォベシン (8 mg/kg, S.C.) の投与を行なった。

全身麻酔下で術野の無菌処置とドレーピングを行い、犬を左側横臥位に保定した。気腹は閉鎖式で実施し、気腹針を刺入後 CO₂ ガスにより気腹を行なった。なお、気腹圧は 10 mmHg 以下とした。完全な気腹を確認後、右側体壁に加えた小切開よりトロッカーカニューレ (Applied Medical Resources Corporation, Tokyo, Japan) を刺入した。次に直径 5 mm の腹腔鏡カメラ (KARL STORZ Endoscopy Japan, Tokyo, Japan) を用いて腹腔内を探索後、腹部正中より 2 本目のトロッカーカニューレを刺入した。さらに、鏡視下で大網脂肪組織を確認し、直径 5 mm の生検鉗子 (KARL STORZ Endoscopy Japan) を用いて脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織は、培養のために滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) に直ちに懸濁した。

2) 犬 DFAT の作製

犬 DFAT の作製は既報を参考に行なった (Matsumoto et al., 2008; Nakano et al., 2020)。脂肪組織の重量を計測し、付着している結合組織および血管を除去した後、0.1% (w/v) コラゲナーゼタイプ II (Sigma-Aldrich, MO, USA)

添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Thermo Fisher Scientific) の中で組織を細切し、振盪させながら 37 °C で 30 分間消化した。100 μ m 口径のフィルターで濾過し、100 g で 1 分間低速遠心分離した。浮遊した成熟脂肪細胞を採集し、20% 牛胎児血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific) 添加 DMEM で満たした 12.5 cm² 培養フラスコ (Corning, NY, USA) に播種した。成熟脂肪細胞がフラスコの培養面に接触するようにフラスコを反転させ、天井培養を行った。天井培養 7 日後に培地を交換し、細胞培養面が底面となるようにフラスコを再び反転させた。

作製した DFAT はサブコンフルエントとなるまで培養したのち、トリプシン EDTA 処理を施し、継代培養した。培地交換は週に 2 回実施した。

3) 慢性肝炎の犬における腹腔鏡下腹腔内脂肪組織の評価

前節より慢性肝炎と診断した犬 25 頭に対し実施した、腹腔鏡下肝生検画像より腹腔内脂肪量を評価した。CT 検査後、犬を右側横臥位に保定し、左側体壁と正中に 2 本のトロッカーカニューレを設置後、健常犬と同様に腹腔内を観察した。肝生検前に腹腔内脂肪を観察し、その分布量を確認した。また、前節における慢性肝炎・進行群の犬 1 頭で腹腔内脂肪組織の採取を試みた。

3. 結果

1) 健常犬における腹腔鏡下脂肪組織採取および犬 DFAT 作製

すべての犬において腹腔内脂肪は容易に目視可能であり、目視可能な脂肪組織は共通して主に鎌状間膜に存在していた (Fig. 2.2.1)。腹腔鏡による鏡視

下で生検鉗子を用いて 10 回、脂肪組織を摘みとった。採取に要した時間の中央値は 6.5 分（範囲：5–15 分）であり、得られた脂肪組織の中央値は 0.4 g（範囲：0.2–0.5 g）であった。全ての犬が脂肪組織の収集手技から問題なく回復した。

作製した犬 DFAT はフラスコ培養面に接着性を示し、線維芽細胞様の形態を示した (Fig. 2.2.2)。フラスコの反転後 8 日目でサブコンフルエントに達し、得られた初代培養細胞数の中央値は 1.6×10^7 個（範囲： $0.7\text{--}1.7 \times 10^7$ 個）であった。これは脂肪組織の単位重量あたりに換算すると 4.0×10^7 個/g（範囲： $3.8\text{--}6.5 \times 10^7$ 個/g）であった。

2) 慢性肝炎の犬における腹腔鏡下脂肪組織の評価

健常犬と同様、慢性肝炎の犬で左側体壁から腹腔鏡で観察できる腹腔内脂肪は共通して鎌状間膜に分布した。また、慢性肝炎・進行群で腹腔内脂肪面積/全体面積比が 8.1% と最も低かった犬においても鎌状間膜に十分な脂肪組織が観察された (Fig. 2.2.3)。慢性肝炎・進行群の 1 例で、生検鉗子を用いて鎌状間膜から脂肪組織を 15 回繰り返し摘むことで 0.3 g の良質な脂肪組織が採取可能であった (Fig. 2.2.4 A)。また、脂肪組織採取後の出血はわずかであった (Fig. 2.2.4 B)。

4. 考察

犬の肝硬変に対して細胞療法は効果が期待される治療法である。近年、腹腔鏡により採取した腹腔内脂肪を利用し、ASC が作製可能であることが報告された (DePompeo et al., 2020)。この報告では、開腹術と比較して腹腔鏡による

脂肪組織採取がより低侵襲であることが示された。しかし、組織細切除去装置を用いて 5 g ほどの多量の脂肪組織が採取され、治療用量の細胞数を確保するためにはより多くの組織量が必要であることが指摘されている (DePompeo et al., 2020)。慢性肝疾患の犬は 6 割程度に食欲不振がみられ、栄養状態の低下を引き起こす症例が存在する (Webster et al., 2019)。したがって、栄養状態の悪い肝硬変の犬では、複数回の細胞投与に十分量の脂肪組織を採取できない懸念がある。DFAT は脂肪組織のコラゲナーゼ処理の過程で浮遊する多量の成熟脂肪細胞を由来とすることから少量の組織から多量の細胞を得ることが可能である。猫 DFAT においては、同一組織から作製された初代培養細胞数が ASC と比較して多い (Kono et al., 2014)。また、本研究から得られた犬 DFAT の単位脂肪重量当たりの初代培養細胞数は 4.0×10^7 個/g であり、過去の犬 ASC の報告 ($0.1-0.2 \times 10^7$ 個/g) と比較して多い (Kisiel et al., 2012; Bearden et al., 2017; DePompeo et al., 2020)。したがって、DFAT は脂肪組織量が少ないことが想定される犬の肝硬変を対象とした細胞療法に応用できる可能性がある。本研究から犬 DFAT は腹腔鏡を用いた脂肪組織採取により、少量 (1 g 未満) の脂肪組織から治療に必要な十分量の細胞数が作製可能であることが明らかとなった。

ASC の細胞源である脂肪組織は全身に分布しているが、これまでに ASC 作製に使用される脂肪組織の由来は主に皮下脂肪もしくは腹腔内脂肪である。特に、開腹手術を必要とせず、侵襲を抑えた採取が可能である皮下脂肪が汎用されてきた。これまでに脂肪組織の由来による ASC の特性差異については研究が進められ、人において表面マーカー発現、分化能、サイトカインや栄養因子の分

泌能力に差がないことが示されている (Baglioni et al., 2009)。人 DFAT においても同様に脂肪組織の由来による細胞学的特性の差はない (Poloni et al., 2012)。したがって、脂肪組織の由来の選択は、採取可能である脂肪組織量と侵襲の程度に依存している。腹腔鏡下で脂肪組織を採取する場合、侵襲を最小限にするためにはトロッカーカニューレの挿入部位 (腹壁) に分布する皮下脂肪を採取することが望ましい。しかし、1 歳前後の健康な犬 (避妊手術時) より脂肪採取を試みた場合、約 3 割の犬で切開部位 (正中腹壁) から皮下脂肪が採取できず、得られた総脂肪組織量は腹腔内脂肪が約 2 倍の重量を示した (Bahamondes et al., 2017)。栄養状態の悪化した肝硬変の犬では皮下脂肪が減少していることが前節で明らかとなっていることから、本研究では腹腔内脂肪のみを採取し、腹腔鏡を用いて容易に脂肪組織の採取が可能であることを明らかにした。

犬の肝硬変では病期の把握のために病理組織学的生検が必須であるが、その採取方法には経皮的針生検、腹腔鏡下肝生検、開腹下肝生検が用いられる (Kemp et al., 2015)。経皮的針生検は最も侵襲が低いものの、採取可能な組織量は不十分であることが多く、貧血を伴う重度の出血リスクが存在するとともに肉眼的な腹腔内の観察はできない。また、開腹下での肝生検は十分な組織量を得ることができ、肉眼的な観察が可能であるが最も侵襲が強い。一方、腹腔鏡下肝生検は開腹下での生検と比較して侵襲が少なく、十分な採取組織量と肉眼的な腹腔内の観察が可能である (Kemp et al., 2015; Reece et al., 2020)。重度に進行した肝硬変の犬では肝機能障害や血液凝固機能障害、腹水の出現といった合併症を生じる (Webster et al., 2019)。特に、肝機能障害は麻酔薬の代謝障害を引き起

こし、凝固機能障害や腹水貯留は出血のリスクを増大させ、麻酔下の処置や組織生検には一定のリスクを伴う(Weil, 2010)。したがって、肝硬変の犬では少ない麻酔回数から最大限のサンプルを得る必要があり、最低限の侵襲から出血など不足の事態への対応が可能である腹腔鏡検査が有用となる。さらに、同一麻酔下で脂肪組織の採取を行うことは低侵襲であるとともに効率的である。本研究から腹腔鏡下での脂肪組織採取は容易でありかつ短時間で採取可能であった。したがって、肝生検と同時に脂肪組織の採取を行うことで肝硬変の犬に対して最低限の侵襲により治療用細胞を確保できる可能性が示された。

腹腔内脂肪組織は健常犬のみならず、慢性肝炎に罹患した犬においても腹腔鏡による観察、採取が容易であった。特に、CT 検査により腹腔内脂肪少ないことが予想された慢性肝炎の犬に対しても硬性鏡により鎌状間膜に十分な腹腔内脂肪組織が観察された。また、慢性肝炎・進行群の犬においても、組織細切除去装置などの特殊な装置を使用することなく、肝生検用生検鉗子により鎌状間膜の脂肪組織を最低限の侵襲、出血のみで安全に採取できた。したがって、慢性肝炎が疑われる犬に腹腔鏡下肝生検を実施する際に、事前に腹腔内脂肪組織を採取し DFAT を作製、保存することが可能と考えられた。また、慢性肝炎の既存の内科療法で治療が困難と判断した症例には保存していた自家脂肪組織由来 DFAT を投与することが可能と思われる。

5. 小括

犬 DFAT は腹腔鏡により採取された少量の脂肪組織から簡便に作製可

能であることが明らかとなり、進行した慢性肝炎の犬においても臨床応用可能であることが示唆された。

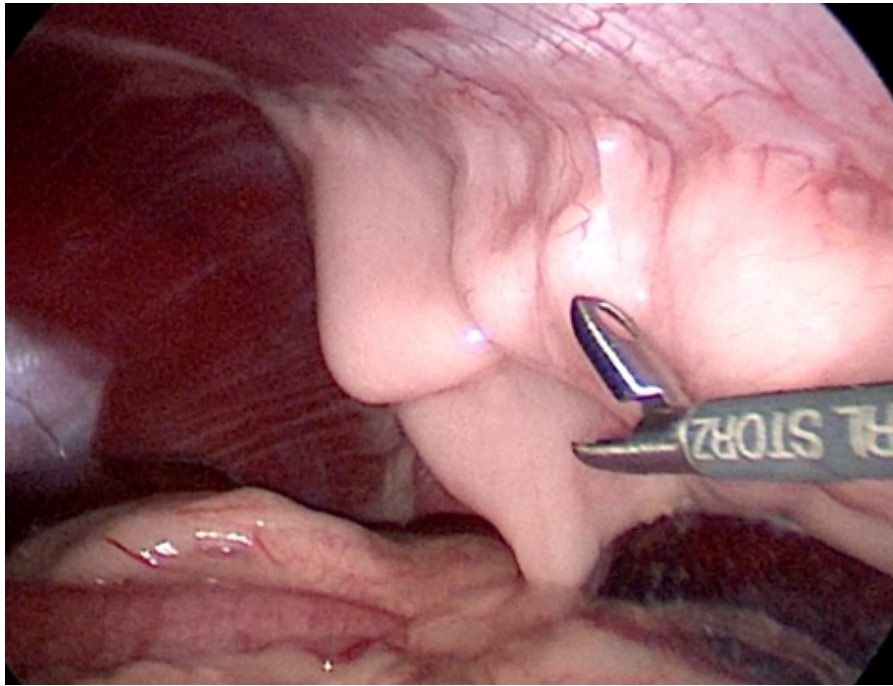


Fig. 2.2.1 健常犬における腹腔内脂肪の腹腔鏡所見

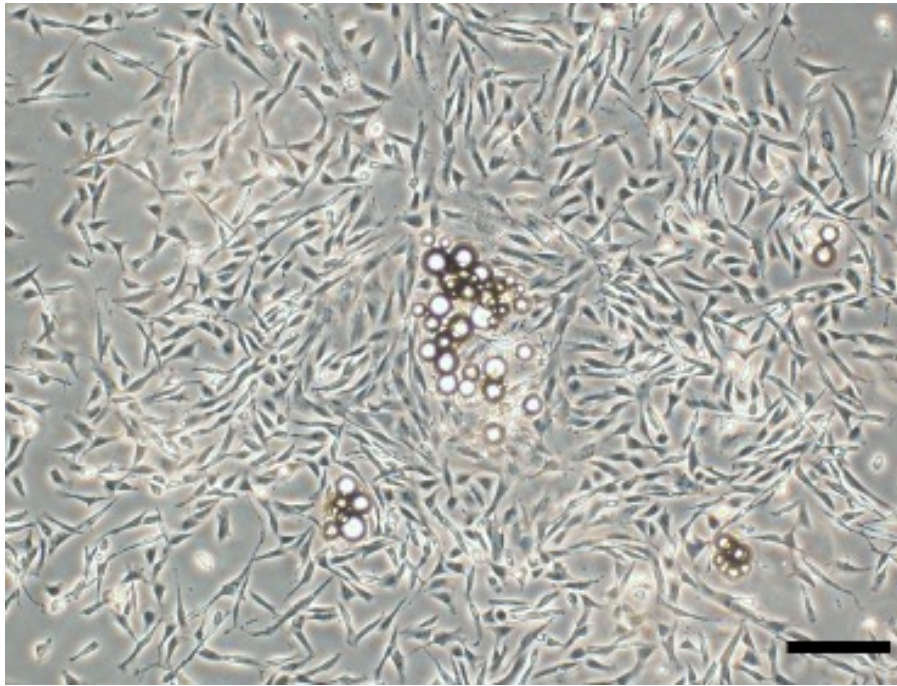


Fig. 2.2.2 腹腔鏡により得られた脂肪組織から作製した犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) の初代培養細胞

犬 DFAT はプラスチックに接着し、紡錘形の線維芽細胞様の形態を示した。

Bar : 200 μ m

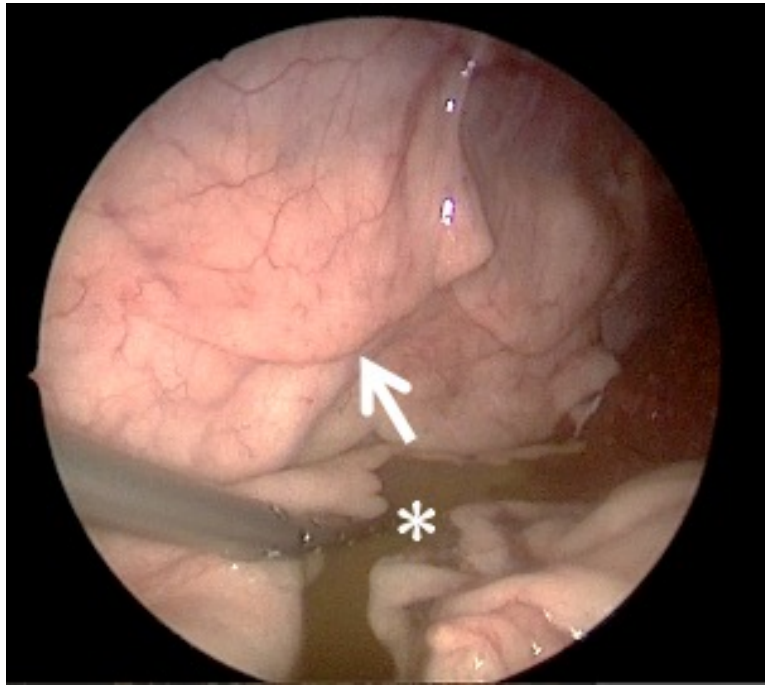


Fig. 2.2.3 慢性肝炎・進行群における腹腔内脂肪の腹腔鏡所見

腹水（*）を伴い腹腔内脂肪面積/全体面積比が8.1%と低い犬においても、鎌状間膜に十分量の脂肪組織（矢印）が観察された。

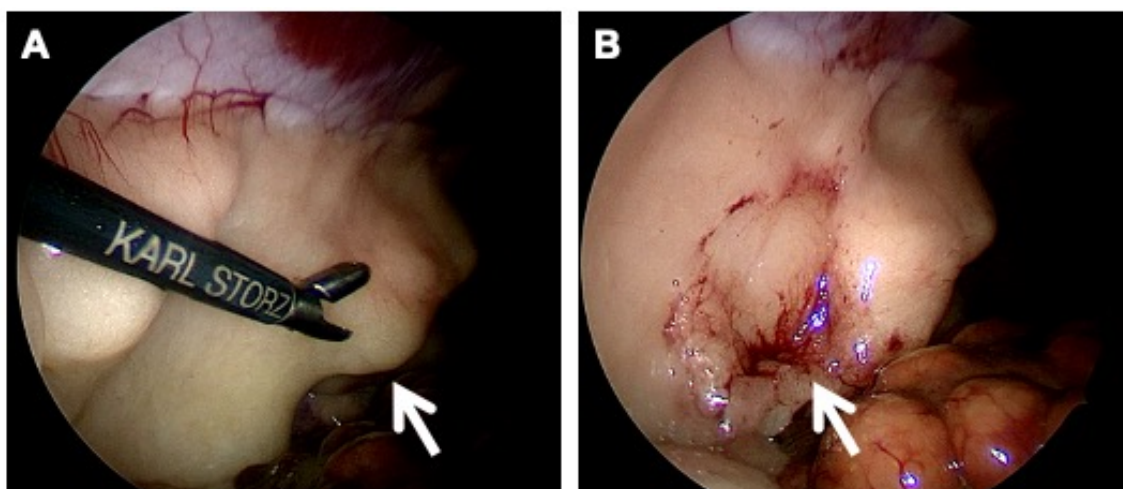


Fig. 2.2.4 慢性肝炎・進行群の犬における腹腔鏡下での腹腔内脂肪組織の採取
生検鉗子を用い鎌状間膜の脂肪組織(矢印)を採取を試みた腹腔鏡像(A)。
脂肪組織(矢印)の採取した後の出血(B)。

第2章 他家犬 DFAT の投与に向けた 主要組織適合性複合体 (MHC) の検討

第1節 犬 DFAT の MHC 遺伝子発現の解析

1. 緒言

犬の肝硬変は有効な治療法がなく、予後が極めて短いことから新規治療法として間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞療法に対する期待が高まっている。特に、低侵襲に採取が可能である脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASC) が注目されている (Teshima et al., 2017)。一般に ASC などの細胞を投与する場合において、拒絶反応の生じない自家由来細胞を使用することが理想的である。しかし、進行した肝硬変の犬では栄養状態の低下から脂肪組織量が減少しており、治療に十分量の自家 ASC の作製に必要な組織量が採取できない可能性があった。したがって、我々は脂肪組織中の成熟脂肪細胞に由来し、少量の脂肪組織から作製可能である脱分化脂肪細胞 (DFAT) に着目した (Matsumoto et al., 2008; Kono et al., 2014)。DFAT は人やマウスにおいて細胞学的形質の解析が行われ、細胞表面抗原の発現状況が MSC と類似しているとされている (Matsumoto et al., 2008)。前章の結果から栄養状態の悪い慢性肝炎の犬においても皮下脂肪組織量と比較して腹腔内脂肪組織は維持されていることが明らかにした。また、慢性肝炎の診断に必須となる肝生検と同一の麻酔処置により、低侵襲にごく少量の脂肪組織を得ることが可能で、この脂肪組織から多量の犬 DFAT を作製することに成功した。しかし、脂肪組織が何らかの要因により採取できない場合や即時的な治療が必要な場合、また、治療が長期化し細胞が枯渇した場合には他家移植も考慮する必要がある。

他家移植において問題となるのが同種抗原 (アロ抗原) であり、中でも、主要組織適合性複合体 (MHC) は主要な移植抗原であり、MHC 遺伝子型の異

なる個体間の他家移植では副作用の懸念が存在する。これまでに犬の MSC 療法では他家移植に際して副作用や移植効率の低下などが報告されており (Isakova et al., 2014; Kang et al., 2014; Wu et al., 2016; Cabon et al., 2019)、DFAT の他家移植を行う場合にも MHC 遺伝子の発現状況を確認する必要がある。

犬由来 DFAT に関する研究は限られており、その細胞形質が十分に研究されていない。したがって、本節では犬 DFAT の MHC 遺伝子発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により解析した。

2. 材料および方法

1) 供試サンプルの調整と RNA 抽出

供試サンプルとして健常ビーグルの献体 5 頭に由来する腹腔内脂肪組織を使用した。使用した犬の年齢と体重の中央値はそれぞれ 2.3 歳齢 (範囲 : 2.3–2.8 歳齢) と 11.8kg (範囲 : 10.6–12.1kg) であった。すべての犬で無菌的に腹部正中切開により鎌状間膜を露出し、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織は直ちに滅菌 PBS 中に懸濁し、犬 DFAT の作製に供した。

犬 DFAT の作製は前章と同様の方法で行なった。まず、脂肪組織の重量を計測し、付着している結合組織および血管を除去した後、コラゲナーゼ処理を行なった。次に、100 μ m 口径のフィルターで濾過し、100 g で 1 分間低速遠心分離した。浮遊した成熟脂肪細胞を採集後、20%FBS および 1% ペニシリン-ストربتマイシン (Sigma-Aldrich, MO, USA) 添加 DMEM で満たした 12.5 cm² 培養フラスコに播種し、天井培養を行なった。また、採集した浮遊成熟脂肪細胞

の一部はサンプルとして QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) 中に回収し、ホモジナイズした。

作製した初代培養 DFAT はサブコンフルエントとなるまで培養したのち、60 mm 細胞培養ディッシュ (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) に播種し継代培養した。20% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン添加 DMEM を増殖培地として週に 2 回培地交換を行なった。

Passage 2 まで継代した DFAT をサンプルとして TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan) とともにセルスクレーパーで回収した。回収したサンプルは RNeasy Mini Kit (QIAGEN K.K.) を用いて製品添付のプロトコルに従い Total RNA を抽出した。また、採取した脂肪組織の一部は QIAzol Lysis Reagent 中でホモジナイズし、陽性コントロールとして使用した。

2) cDNA 合成

抽出したサンプルを NanoDrop-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて RNA 量を測定し、RNA 濃度を 500 ng になるように調整した。調整した Total RNA を Super Script VILO master Mix (Thermo Fisher Scientific K.K.) と混合し、サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan) を用いて 25°C で 5 分、42°C で 30 分、85°C で 5 分インキュベートし、cDNA 合成を行なった。

3) RT-PCR

対象とする MHC 遺伝子は、MHC クラス I 遺伝子として *DLA-12* および *DLA-88* を、クラス II 遺伝子として *DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1* を調査した。RT-PCR は TaKaRa ExTaq (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) を用いて行なった。サーマルサイクラーを用いて、95°C で 2 分反応させた後、96°C で 30 秒間変性させ、55–63°C で 30 秒間アニーリングし、72°C で 60 秒間伸長させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた。PCR 産物は、Atlas ClearSight (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan) を添加した 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、UV トランスイルミネーター上で増幅産物を確認した。また、CS Analyzer 3 (ATTO Corp., Tokyo, Japan) を用いて各陽性バンドを内部標準遺伝子 (GAPDH) の発現に対する相対発現量として半定量解析を行なった。なお、使用したプライマーシーケンスを Table 2.1 に示した。

4) 統計処理

成熟脂肪細胞と DFAT における MHC 遺伝子発現量は Paired-t 検定を用いて比較した。統計は GraphPad PRISM for Mac OS X version 5.0b にて解析し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

各遺伝子に対する PCR 結果および成熟脂肪細胞と DFAT の MHC 遺伝子発現量に関する比較結果をそれぞれ Fig. 3.1.1 および 3.1.2 に示した。MHC クラス I の 2 遺伝子 (*DLA-12* および *DLA-88*) は DFAT、成熟脂肪細胞ともに発現が見られ、発現量に有意差は認められなかった。また、MHC クラス II の 3

遺伝子 (*DLA-DRB1*, *DLA-DQA1* および *DLA-DQB1*) は *DLA-DRB1* について DFAT に発現はほぼ見られず、成熟脂肪細胞と比較して有意に発現が低かった ($P=0.03$)。 *DLA-DQA1* に関しては DFAT と成熟脂肪細胞の両者に発現が認められ、有意差は認められなかった。 *DLA-DQB1* はともに発現はほぼ認められなかった。

4. 考察

肝硬変の犬に DFAT を臨床応用する際には、症例から採取した脂肪組織から DFAT を作製し適切な細胞数に至るまで培養・増殖する必要がある、この過程には通常数週間の時間を要する。進行した肝硬変の犬は重篤な臨床症状を示すことから治療開始に猶予がない症例や、麻酔下での処置が行えない症例が存在する。つまり、自家の脂肪組織を準備できない場合には治療の適切なタイミングを逃す可能性がある。したがって、症例の侵襲を避ける必要がある場合や即時的な治療が求められる場合には DFAT の他家移植が非常に有効となるが、犬 DFAT の MHC 遺伝子発現に関する情報は限られていた。本研究の結果から犬 DFAT には複数の MHC 遺伝子 mRNA の発現が認められ、一定の免疫原性を有する可能性が示唆された。

細胞療法において移植細胞表面上に発現した MHC クラス I 分子がレシピエントの CD8 陽性 T 細胞によって認識され、直接的な細胞傷害につながる可能性がある。また、MHC クラス II 分子はレシピエントの CD4 陽性 T 細胞によって認識され、細胞毒性または体液性免疫応答を引き起こす。実際に、MHC

遺伝子型の不一致は細胞免疫応答と体液免疫応答の両方を引き起こし、他家移植の有効性が低下する可能性が指摘されている (Isakova et al., 2014; Wu et al., 2016; Cabon et al., 2019)。Isakova らはマカカザルを用いて自家および MHC 不一致個体由来の MSC を作製し頭蓋内投与実験を行った。その結果、MHC 不一致ペアの末梢血液中の T 細胞とナチュラルキラー細胞の有意な増加が認められたのに対し、自家 MSC では反応が見られなかった。また、MHC 不一致ペアではドナー MSC を傷害可能な白血球が検出された。さらに、ドナーとレシピエント間の MHC クラス I と MHC クラス II 遺伝子の不一致の程度が免疫応答の大きさと相関しており、ドナー MSC に対する免疫応答が MHC 特異的であることを裏付けた (Isakova et al., 2014)。Wu らは MHC クラス I 遺伝子が不一致である犬骨欠損モデルを用い、他家 MSC および自家 MSC の骨再生に対する影響を検討した。その結果、他家移植では骨形成能力の低下や末梢血液中の炎症性サイトカインの増加、CD4 および CD8 陽性 T 細胞の増加が認められた (Wu et al., 2016)。したがって、MSC の他家移植では MHC 遺伝子不適合による拒絶反応の存在が示唆され、同様に DFAT の他家移植を実施するためには犬 DFAT の MHC 発現に関して解析を行う必要があった。

MHC 分子は主要な移植抗原であり、高度な多型性を有することにより病原微生物などの異種抗原の排除に寄与しているが、非自己の MHC を有する他家移植を行う際には障壁となり拒絶反応に関与する (Sato et al., 2020 b)。しかし、犬 MSC の MHC 遺伝子発現を詳細に調査した報告は極めて少ない。犬胎児付属器由来 MSC や犬 ASC は MHC クラス I 遺伝子である *DLA-79* およびクラ

ス II である *DLA-DRA1* や *DLA-DQA1* の遺伝子発現が認められる (Filioli Uranio et al., 2011; Marcoccia et al., 2021)。また、Poloni らは人 DFAT および成熟脂肪細胞の MHC クラス I (HLA-A) 遺伝子発現を確認している (Poloni et al., 2015)。犬の MHC 分子を規定する遺伝子は MHC クラス I として 4 遺伝子座 (*DLA-88*, *DLA-12*、*DLA-64* および *DLA-79*) およびクラス II として 4 遺伝子座 (*DLA-DRA*, *DLA-DRB1*, *DLA-DQA1* および *DLA-DQB1*) に関して多型解析が行われ、*DLA-64*, *DLA-79* および *DLA-DRA* の 3 遺伝子は多型が極めて少ない (Miyamae et al., 2019)。マカカザル由来 MSC を用いた研究では、MHC の適合遺伝子座数の差により拒絶の程度が異なることが報告されている (Isakova et al., 2014)。つまり、有効な犬 DFAT の他家移植を成功させるためには多型の存在する複数の MHC 遺伝子についてマッチングを行う必要がある。したがって、本研究では将来的な MHC 遺伝子のマッチングを想定し、犬において特に多型が多いとされる 5 遺伝子について mRNA 発現解析を行なった。その結果、3 遺伝子 (*DLA-88*, *DLA-12* および *DLA-DQA1*) について体細胞である成熟脂肪細胞と同程度に発現することを明らかにした。

本研究では 2 つの MHC クラス I 遺伝子 (*DLA-88* および *DLA-12*) および 1 つのクラス II 遺伝子 (*DLA-DQA1*) について中程度から高度の mRNA 発現を確認した。一般に MSC は MHC クラス I 分子の発現が中程度であり、クラス II 分子や共刺激分子の発現が認められない。さらに、免疫担当細胞の機能を抑制する免疫調整作用が強いことから免疫原性が低いとされている (Voga et al., 2020)。同様に、人やマウス DFAT はフローサイトメトリーを用いた蛋白発現解

析において MHC クラス I 分子の発現が認められ、クラス II 分子の発現がない (Matsumoto et al., 2008)。犬 ASC では MHC クラス II の mRNA 発現が確認されているものの、フローサイトメトリーを用いた蛋白発現解析においては発現が見られなかった (Screven et al., 2014)。したがって、mRNA 発現解析とフローサイトメトリーの結果に相違が存在し、本研究において確認された MHC クラス II 遺伝子 (*DLA-DQA1*) における転写レベルでの遺伝子発現が必ずしも機能的な蛋白へと翻訳されない可能性を示している。一方、Cabon らは犬 MSC を用い、フローサイトメトリーにより検出できなかった MHC クラス II 分子が炎症性サイトカインであるインターフェロン γ の暴露後に細胞表面に発現したと報告している (Cabon et al., 2019)。Hakim らはマウスの脊髄損傷モデルにおいて、MSC 投与前後で MHC クラス II 分子の発現が増加することを確認しており、*in vivo* でも同様の現象が生じることを示した (Hakim et al., 2019)。したがって、慢性的な炎症が存在する肝硬変の犬に対して DFAT を使用する際には、MHC クラス II 遺伝子に関してもマッチングの対象であることが示唆された。

本研究は複数の MHC 遺伝子を対象として mRNA 発現を詳細に解析した。その結果、体細胞である成熟脂肪細胞とほぼ同程度発現が見られることが明らかとなった。したがって、安全にかつ効率的に DFAT の他家移植を行うためには、MHC 型を一致させたドナーの選択を行う必要があることが示唆された。また、これまで犬において複数の MHC 遺伝子を本研究同様に詳細に分析し、マッチングさせた上で他家移植を行なった報告は存在しない。そのため、シーケンスに基づいた MHC 遺伝子型のマッチングが移植医療に有用であるか検討

する必要があったと考えられた。

5. 小括

犬 DFAT は複数の MHC 遺伝子 mRNA の発現が認められることから、他家移植を行う場合には MHC 型のマッチングを行う必要があることが示唆された。

| 遺伝子 | 塩基配列 | 増幅産物 | アニーリング温度 |
|----------|---|------------|----------|
| DLA-12 | Fw: CGACCCTAAAGGTCTGGGCTA Rv: GGTGGCGGGTCACACG | 660 bp | 63°C |
| DLA-88 | Fw: CGGAGATGGAGGTGGTGA Rv: GGTGGCGGGTCACACG | 654-657 bp | 63°C |
| DLA-DRB1 | Fw: GCACCCTGTCCTTTCTG Rv: TCACCATCTCCACTTCAG | 841 bp | 60°C |
| DLA-DQA1 | Fw: AGTTCTGATTCTGGGGAC Rv: TCTGGGAGGTGGGCAT | 797 bp | 60°C |
| DLA-DQB1 | Fw: CAGGTAGGAGCTGTGTTGAC Rv: CGGTATCCTCAGGCATC | 872 bp | 60°C |
| GAPDH | Fw: GGGAAAGCTTGTCATCAATGG Rv: GTTGTCATGGATGACCTTGG | 308 bp | 56°C |

Table. 2.1 RT-PCR に使用したプライマーシーケンス一覧

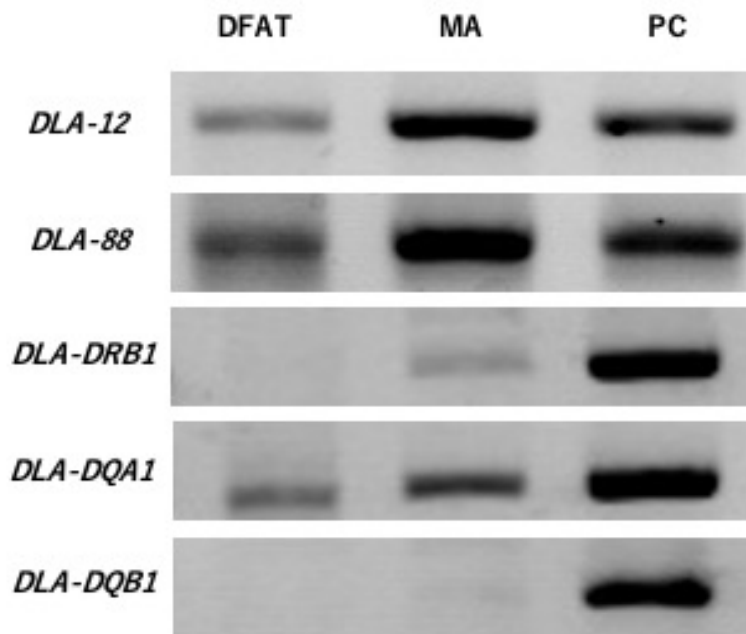


Fig. 3.1.1 各主要組織適合性複合体 (MHC) 遺伝子における犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) および成熟脂肪細胞 (MA) の mRNA 発現解析結果

DFAT : 脱分化脂肪細胞、MA : 成熟脂肪細胞、PC : ポジティブコントロール

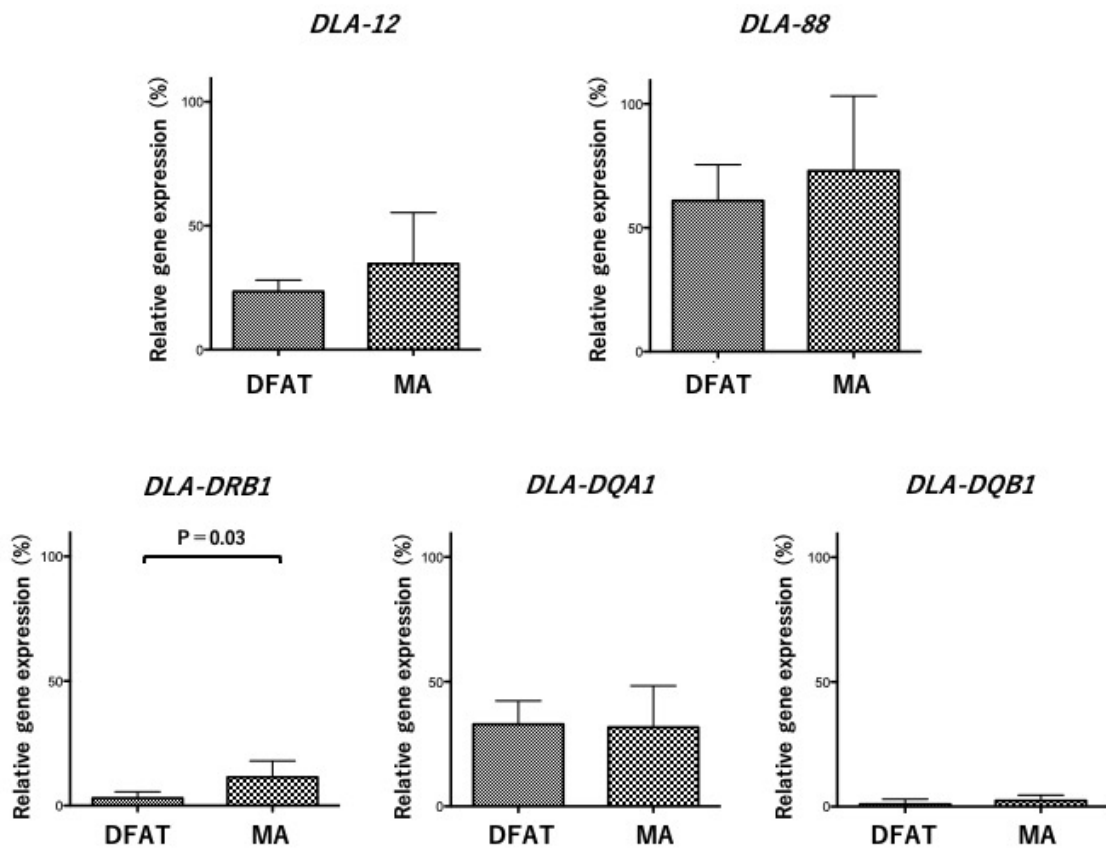


Fig. 3.1.2 各主要組織適合性複合体 (MHC) 遺伝子における犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) および成熟脂肪細胞 (MA) の mRNA 発現解析結果 (半定量解析)

第2章 他家犬脱分化脂肪細胞の投与に向けた 主要組織適合性複合体（MHC）の検討

第2節 MHC 遺伝子マッチングの有用性

1. 緒言

主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) は細胞表面に発現し、免疫系への自己および非自己抗原提示に関与する糖タンパク質であり、病原体の排除に働く。一方で、MHC 分子は移植片拒絶反応を引き起こす主要な免疫学的障壁でもあり、移植された非自己臓器および細胞の拒絶反応などの免疫応答において基本的な役割を果たす (Wagner et al., 1999)。したがって、一般に MHC 型が一致しない他家間葉系幹細胞 (MSC) 移植は、抗体産生などの免疫応答を誘発し、移植された細胞の生存率を低下させる (Isakova et al., 2014; Wu et al., 2016; Cabon et al., 2019)。医学領域の臓器移植では、拒絶反応の抑制を目的としてドナーとレシピエントの MHC 遺伝子を詳細に解析した上でのマッチングが頻繁に行われている。また、MHC 遺伝子の不適合遺伝子座数は、他家臓器移植における移植片拒絶に関連している (Lee et al., 2007; Rudolph et al., 2016; Williams et al., 2016)。しかし、犬の他家移植において MHC クラス I および II 遺伝子座を詳細に解析し、マッチングを行なった報告は極めて少ない。

我々の研究グループではこれまでに犬 MHC の多型分析に基づいて、MHC クラス I (*DLA-88* および *DLA-12/88L*) およびクラス II (*DLA-DRB1*、*DLA-DQA1* および *DLA-DQB1*) 遺伝子座のシーケンスベースタイピング法を確立している (Miyamae et al., 2018, 2019)。また、犬を対象とした他家移植におけるアロ反応性 T 細胞の評価に有用であるフローサイトメトリー混合リンパ球反応 (Mixed lymphocyte reaction: MLR) 法を確立した (Miyamae et al., 2019)。

前章より犬 DFAT には複数の MHC 遺伝子の mRNA 発現が認められたことから、他家移植に際しては免疫原性が危惧される。したがって、効率的かつ安全な犬 DFAT の他家移植を成功させるため、MHC 遺伝子のシーケンスベースタイピングに基づくマッチングの有効性を、他家移植が最も困難である皮膚移植 (*in vivo*) および MLR (*in vitro*) により検証した。

2. 材料および方法

1) 供試動物

MHC 遺伝子の DNA シーケンスに基づいて選択した 8 頭の健常ビーグル犬を使用した。既報を元に決定した供試動物の MHC シーケンスおよびハプロタイプ推定結果を Table 2.2.1 に示した(Miyamae et al., 2018, 2019)。全ての犬は 1 頭のドナーと 3 頭のレシピエントを含む Set 1 (Dog 1 から Dog 4) および Set 2 (Dog 5 から Dog 8) の 2 セットに分けた。また、レシピエントは推定したハプロタイプに基づき、ドナーとすべての MHC 遺伝子座が完全に一致 (完全一致)、一方のハプロタイプのみ一致 (半一致) もしくはすべての MHC 遺伝子座の相違 (不一致) する犬をそれぞれ 1 頭ずつ選定した。年齢はセットごとに統一し、その中央値はそれぞれ 2.7 歳齢 (範囲: 2.4–3.0 歳齢) および 5.0 歳齢 (範囲: 4.4–5.0 歳齢) であった。それぞれのセットはレシピエントとして 1 頭の雌を含む Set 2 を除き、すべて雄で構成した。

医学領域において MHC 型のみならず、血液型も他家移植に影響を与える可能性がある (Shimizu et al., 2003)。そこで、血液型判定および血液交差適合

試験のため、すべての犬の頸静脈から抗凝固剤として EDTA を含むチューブに全血を採取した。採取したサンプルは富士フイルム VET システムズ株式会社 (Tokyo, Japan) に解析を依頼した。血液型は犬赤血球抗原 (Dog erythrocyte antigen : DEA) 1.1 および 1.2 を凝集法により判定した。また、各セットにおけるドナーとレシピエント間の血液交差適合試験を凝集法により実施した。

2) 皮膚移植

すべての犬は全身麻酔下で同一術者により移植手術を行った。全身麻酔はアトロピン塩酸塩 (0.04 mg/kg, S.C.) および酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) により前投与を行い、プロポフォール (7 mg/kg, I.V. to effect) により麻酔導入した。導入後、気管挿管を行い、イソフルランにより麻酔維持を行なった。術後鎮痛及び感染症対策として酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) およびセフォベシン (8 mg/kg, S.C.) の投与を行なった。

各ドナーから直径 8mm の生検パンチ (Kai Industries Co. Ltd., Gifu, Japan) を使用し、腰背部より皮膚移植片を採取した。同様にレシピエントから皮膚片を切除し、ドナー皮膚をレシピエント犬に縫合することによって移植した。また、皮膚移植手技による影響を排除する目的で自家皮膚移植を行った。さらに、他家移植および自家移植はそれぞれ2箇所ずつ実施した。皮膚移植後 2-3 日ごとに包帯を交換し、移植片を観察した。移植7日目に、移植手術と同様に全身麻酔を施し、他家移植片および自家移植片のうち1箇所を切除生検した。また、残存した (2箇所目の自家移植片および他家移植片) は、経時的に観察を継続し、他家移植片の肉眼的壊死が観察された時点で病理組織学的評価のために

切除生検した。移植手技および生検のタイミングを Fig. 3.2.1 に示した。

生検した各標本は 10 %中性緩衝ホルマリンで固定したのちパラフィンに包埋し、HE 染色により光学顕微鏡で評価した。病理組織学的な壊死および炎症細胞浸潤の程度を移植後 7 日目に評価した。また、リンパ球浸潤の程度は定性的に最小、軽度、中程度または重度の順にスコアリングした。

3) 混合リンパ球反応 (MLR)

ドナーとレシピエントに対する MLR は過去の報告を元に実施した (Miyamae et al., 2019)。各犬から密度勾配遠心分離によって末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell : PBMC) を分離した後、レスポンダー (レシピエント) PBMC を CytoTell (AAT Bioquest, CA, USA) により標識した。CytoTell 標識レスポンダー T 細胞を 96 ウェルプレートでマイトマイシン C (Fujifilm Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan) で処理したステイミュレーター (ドナー) PBMC と混合した。レスポンダーおよびステイミュレーター T 細胞は 1×10^6 細胞/ ml の濃度に調整した。7 日間のインキュベーション後、各ウェルの細胞を回収し、フローサイトメーターで分析した。レスポンダーのアロ反応性 T 細胞増殖は、CytoTell 蛍光強度の減衰歴を追跡することによって定量化し、刺激指数 (SI 値) を算出した。SI 値の計算は過去の報告と同様に行なった (Miyamae et al., 2019)。

4) 統計解析

等分散モデルを想定した Paired-t 検定を行い、多重比較には Bonferroni

補正を使用した。さらに、SI 値と肉眼で確認された生着の期間との相関関係は、Spearman の相関係数によって評価した。統計解析には R statistical program (ver. 3.3.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

1) 血液交差適合試験および血液型判定

Set 1 のレシピエントうち 1 頭が DEA1.1 に対し陽性を示した。しかし、血液交差適合試験は主試験および副試験ともに陰性であった。Set 2 のレシピエントのうち、DEA 1.1 陽性の犬が 2 頭含まれ、ともに副試験が陽性を示した (Table 2.2.2)。

2) 皮膚移植

各セットの皮膚移植 7 日目における病理組織学的所見および肉眼的な壊死を認めるまでに要した日数を Table 2.2.3 に示した。他家移植片は MHC 不一致ペアにおいて移植 11 日目に拒絶された。また、MHC 半一致ペアでは、各セットにおいてそれぞれ 11 日目と 14 日目に拒絶された。一方、MHC 完全一致ペアにおいては Set 2 では 18 日目、Set 1 では 21 日目まで移植片が生着した (Fig. 3.2.2)。

MHC 不一致ペアにおける移植 7 日目の病理組織学的評価では、移植片とレシピエント皮膚との境界 (移植片境界) および移植片中心部に中等度から重

度のリンパ球浸潤が観察された。Set 2 の MHC 半一致ペアでは移植片境界および移植片中央部に軽度から中等度のリンパ球浸潤と壊死が認められ、Set 1 では同様のリンパ球浸潤が認められたが壊死は認められなかった。完全一致ペアでは移植片の中央部が損傷し、部分的な上皮欠損や好中球浸潤および壊死が見られた。しかし、移植片中央部には最小限のリンパ球細胞浸潤のみが含まれており、移植片境界が不明瞭であった (Fig. 3.2.3)。また、肉眼的な壊死が観察された時点で採取された病理組織標本には重度のリンパ球浸潤と壊死が MHC 半一致および完全一致ペアの双方で観察された。一方、完全不一致ペアにおいてはリンパ球の浸潤が少なく、移植片は線維芽細胞と肉芽組織に部分的に置換されていた。

すべてのレシピエントについて、自家移植片の生着は各時点において肉眼的かつ病理組織学的に確認された。移植 7 日目の肉眼的所見として移植片中央が損傷しており、縫合手技による損傷と考えられた。移植 7 日目の病理組織学的所見では、移植片境界が不明瞭である一方で、移植片中央部の部分的な上皮欠損や好中球細胞浸潤および壊死が観察された。これらの縫合手技に伴う物理的創傷は、2 回目の生検時点で改善されていた。

3) 混合リンパ球反応

MHC シーケンスの結果に基づき、Dog 1 と Dog 5 をそれぞれ Set 1 と Set 2 におけるドナーとして使用した。いずれのセットにおいても MHC 不一致ペアの SI 値は、完全一致ペアと比較し有意に高値を示した ($P < 0.001$)。Set

2において MHC 半一致ペアの SI 値は完全一致ペアの SI 値と比較し有意に高値を示した ($P < 0.01$)。一方、Set 1 の MHC 半一致ペアと完全一致ペアの SI 値に有意差は認められなかった (Fig. 3.2.4)。また、いずれのセットにおいてもレスポンドー (レシピエント) の T 細胞アロ反応性の大きさがステイミュレーター (ドナー) とレスポンドー間の MHC ミスマッチアレル数と相関していた ($P < 10^{-7}$)。さらに、SI 値と移植片の生着期間の間には負の相関が認められた ($P = 0.02$) (Fig. 3.2.5)。Set 2 におけるレスポンドー犬のアロ反応性 CD4 および CD8 陽性 T 細胞増殖を定量化したところ、不一致ペアの CD4 および CD8 陽性 T 細胞の SI 値は完全一致ペアの SI 値よりも有意に高かった ($P < 0.01$) (Fig. 3.2.6)。

4. 考察

著者の知る限り、本研究は犬を用いてドナーおよびレシピエント間で MHC 遺伝子のシークエンスベースタイピングに基づく MHC 型の判定を行なった上で、他家皮膚移植を行なった最初の報告である。MHC 分子は、移植後の免疫反応に関与する主要な移植障壁であり、臓器移植の可否はドナーとレシピエント間の MHC 適合性に依存する。医学領域では MHC 遺伝子のシークエンスベースタイピングに基づく臓器移植が一般的であり、MHC マッチングを伴う臓器移植は急性拒絶反応を軽減し、移植片の生存を延長するとともにレシピエントの死亡率を低減する (Lee et al., 2007; Rudolph et al., 2016; Williams et al., 2016)。本研究の結果でも、MHC 半一致および不一致ペアにおける他家移植片は 14 日以内に拒絶されたが、完全一致ペアでは最長 21 日間生着した。MHC 型が不一致であるマウスや犬の他家皮膚移植では、移植 6 日目から 12 日目に皮膚

移植片が拒絶される (Abb et al., 1978; Cheng et al., 2017) ことから、MHC 遺伝子のマッチングを行うことで他家皮膚移植片の生着期間が延長することが明らかとなった。

本研究では、MHC 遺伝子に対しシーケンスベースタイピングを実施し、ドナーおよびレシピエントを選択した。犬においてこれまでに限られた MHC 遺伝子座のシーケンスデータまたはマイクロサテライトマーカーに基づいてドナーとレシピエントを選択した報告は存在するものの (Wagner et al., 2000; Kornblit et al., 2013)、複数遺伝子座に対して DNA シーケンスに基づいた MHC 型のタイピングを実施した上で、臓器移植を行なった報告はない。また、犬種ごとの MHC 遺伝子の変異と多型は、マイクロサテライトマーカーと比較してシーケンスベースタイピングでより詳細に検討されており、直接的に MHC 遺伝子の多型を検出可能である (Miyamae et al., 2018)。また、マイクロサテライトマーカーは多様な MHC 対立遺伝子を持つ犬種ごとのデータは存在せず、実際に臨床応用するには不十分であると考えられる。Heineman らは犬の小腸他家移植を実施し、MHC 型不一致のペアと比較して、MHC 型の一致したペアの生存期間が延長することを示した (Heineman et al., 1991)。しかし、この研究では MHC タイピングが血清学的手法と MLR にのみ基づいている (Heineman et al., 1991)。血清学的手法は MHC タイピングに古くから用いられてきた方法であるが、犬において特定の MHC 分子に対する安定した抗血清が入手できないことが多く、実際の臨床での使用は困難である。また、医学領域では MHC 遺伝子タイピングに基づく移植を行なった群が血清学的分類に基づい

て移植された群と比較して高い生存率を示しており、DNA シークエンスベースタイピングが血清学的タイピングより精度が高い(Edinur et al., 2015)。したがって、本研究は犬の移植医療における MHC 遺伝子のシークエンスベースタイピングおよびマッチングの有用性を明らかにした。

医学領域の他家臓器移植において MHC マッチングの有効性が示されているが、人の各対立遺伝子やハプロタイプは極めて多様性に富み、完全に MHC 型が一致したドナーの検索は不可能に近い。したがって、ドナーに対し感染や悪性腫瘍形成などの副作用を引き起こす可能性のある免疫抑制剤を生涯にわたり投与する必要がある(Zachary et al., 2016)。犬の他家腎移植後の長期的転帰に関する研究では、生涯にわたる免疫抑制剤の投与が必要であり、感染性の合併症が死因のうち 23%を占める(Hopper et al., 2012)。したがって、臓器移植後の長期的予後を達成させるためには免疫抑制剤の休薬または削減が有益である。MHC 型を適合させた人工多能性幹細胞の霊長類移植モデルでは、MHC の一致によりリンパ球の移植片への浸潤を抑制させ、免疫抑制剤の投与量を減らしうる可能性が示唆された(Morizane et al., 2017)。本研究でも、ドナーとレシピエント間の MHC 型をマッチングさせることにより移植片に対するリンパ球の反応を低下させ、移植片の生存を延長することを明らかにした。したがって、シークエンスベースタイピングに基づく他家移植を実施することで副作用を抑制し、免疫抑制剤の投与量を減らしうる可能性が示された。

今回、犬の肝硬変に対して DFAT の他家移植を効率的かつ安全に実施す

ることを目的として、シークエンススペースの MHC タイピングが他家移植に与える影響を他家移植が最も困難であるとされる皮膚移植により検証し、MHC 遺伝子型のマッチングが犬の皮膚移植片の生着を延長することを明らかにした。しかし、完全な MHC 適合ドナーを使用しても、移植片は最終的に拒絶された。臓器の免疫原性は臓器間で異なり、皮膚は MHC 分子と比較して弱い免疫応答を誘発する皮膚特異的なマイナー抗原が存在することから、他の臓器と比較して特に高い免疫原性を有する (Fuchimoto et al., 2001)。また、人では Y 染色体上にコードされたマイナー抗原が移植片生着率低下と関連しており (Popli et al., 2014)、犬においても Y 染色体に関連するマイナー抗原の存在が示唆されている (Weber et al., 2003)。Set 2 の MHC 完全一致レシピエントが雌であることから、雌雄差が拒絶に関連した可能性がある。さらに、本研究では血液交差適合試験により副試験が陽性であった犬が 2 頭存在しており、医学領域では血液型の差異や血液交差適合試験の反応性により拒絶反応を引き起こすことが報告されている (Shimizu et al., 2003; Gehrie et al., 2013)。したがって、マイナー抗原に対する免疫応答により本研究における遅発拒絶反応を生じた可能性が示された。

本研究では、MLR の結果が移植片生存と関連することを明らかにした。MLR は移植前に実施することが可能であり、*in vitro* でのドナーとレシピエント間の MHC 不適合性に関連する免疫応答を再現可能である (Miyamae et al., 2019)。人においてドナー反応性 T 細胞の活性化は移植片に浸潤するリンパ球と密接に関連しているため、MLR は移植後の急性拒絶反応の予測とモニタリングに役立つとされている (Tanaka et al., 2005)。本研究では、Set 2 の半一致ペアと

不一致ペアにおいて MLR を介してアロ反応性 CD4 および CD8 陽性 T 細胞増殖が観察された。これら T 細胞の増殖が移植 11 日後に認められた移植片の急性拒絶を誘発した可能性がある。また、Set 1 の MHC 不一致ペアで有意なアロ反応性 T 細胞増殖を検出した。Set 1 では CD4 および CD8 陽性 T 細胞のアロ反応性を定量化していないが、皮膚移植後に Set 2 と同様に移植片拒絶反応が観察されたことから T 細胞を介した急性移植片拒絶反応があった可能性が示唆された。したがって、本研究結果からフローサイト MLR を使用することで *in vivo* において移植を行う前にアロ反応性 T 細胞を介した移植片拒絶反応を予測できる可能性が示された。

5. 小括

本研究から *in vivo* (皮膚移植) および *in vitro* (フローサイト MLR) 法を使用して、犬における MHC 遺伝子のシーケンスベースタイピングの有用性を確認した。その結果、犬の皮膚移植モデルにおけるドナーとレシピエント間の MHC 遺伝子型を一致させることにより移植片の生存期間が延長することを明らかにした。さらに、MLR の結果は皮膚移植の結果をよく反映していた。したがって、ドナーの選択に遺伝子タイピングに基づく MHC 型のマッチングは有用であり、犬 DFAT においても他家移植の効率を向上させうる可能性が示唆された。

| 個体番号 | 性別 | ハプロタイプ ID | MHC 遺伝子座 | | | | |
|-------|--------|-----------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| | | | <i>DLA-88</i> | <i>DLA-12</i> | <i>DLA-DRB1</i> | <i>DLA-DQA1</i> | <i>DLA-DQB1</i> |
| Dog 1 | Male | Hp.1 | <i>*502:01</i> | <i>*1</i> | <i>*001:02</i> | <i>*001:01</i> | <i>*002:01</i> |
| | | Hp.2 | <i>*012:01</i> | <i>*1</i> | <i>*015:01</i> | <i>*009:01</i> | <i>*001:01</i> |
| Dog 2 | Male | Hp.1 | <i>*502:01</i> | <i>*1</i> | <i>*001:02</i> | <i>*001:01</i> | <i>*002:01</i> |
| | | Hp.2 | <i>*012:01</i> | <i>*1</i> | <i>*015:01</i> | <i>*009:01</i> | <i>*001:01</i> |
| Dog 3 | Male | Hp.2 | <i>*012:01</i> | <i>*1</i> | <i>*015:01</i> | <i>*009:01</i> | <i>*001:01</i> |
| | | Hp.3 | <i>*502:01</i> | <i>*1</i> | <i>*001:01</i> | <i>*001:01</i> | <i>*002:01</i> |
| Dog 4 | Male | Hp.3 | <i>*502:01</i> | <i>*1</i> | <i>*001:01</i> | <i>*001:01</i> | <i>*002:01</i> |
| | | Hp.4 | <i>*501:01</i> | <i>*1</i> | <i>*006:01</i> | <i>*005:011</i> | <i>*007:01</i> |
| Dog 5 | Male | Hp.4 | <i>*501:01</i> | <i>*1</i> | <i>*006:01</i> | <i>*005:011</i> | <i>*007:01</i> |
| | | Hp.5 | <i>*045:01</i> | <i>*1</i> | <i>*novL</i> | <i>*004:01</i> | <i>*013:03-<i>*017:01</i></i> |
| Dog 6 | Female | Hp.4 | <i>*501:01</i> | <i>*1</i> | <i>*006:01</i> | <i>*005:011</i> | <i>*007:01</i> |
| | | Hp.5 | <i>*045:01</i> | <i>*1</i> | <i>*novL</i> | <i>*004:01</i> | <i>*013:03-<i>*017:01</i></i> |
| Dog 7 | Male | Hp.4 | <i>*501:01</i> | <i>*1</i> | <i>*006:01</i> | <i>*005:011</i> | <i>*007:01</i> |
| | | Hp.6 | <i>*041:01</i> | <i>*1</i> | <i>*013:01</i> | <i>*003:01</i> | <i>*005:01</i> |
| Dog 8 | Male | Hp.2 | <i>*012:01</i> | <i>*1</i> | <i>*015:01</i> | <i>*009:01</i> | <i>*001:01</i> |
| | | Hp.7 | <i>*005:01</i> | <i>*nov2</i> | <i>*020:01</i> | <i>*004:01</i> | <i>*013:01</i> |

Table 2.2.1 実験に使用した犬の主要組織適合性複合体 (MHC) ハプロタイプ情報

Hp : ハプロタイプ

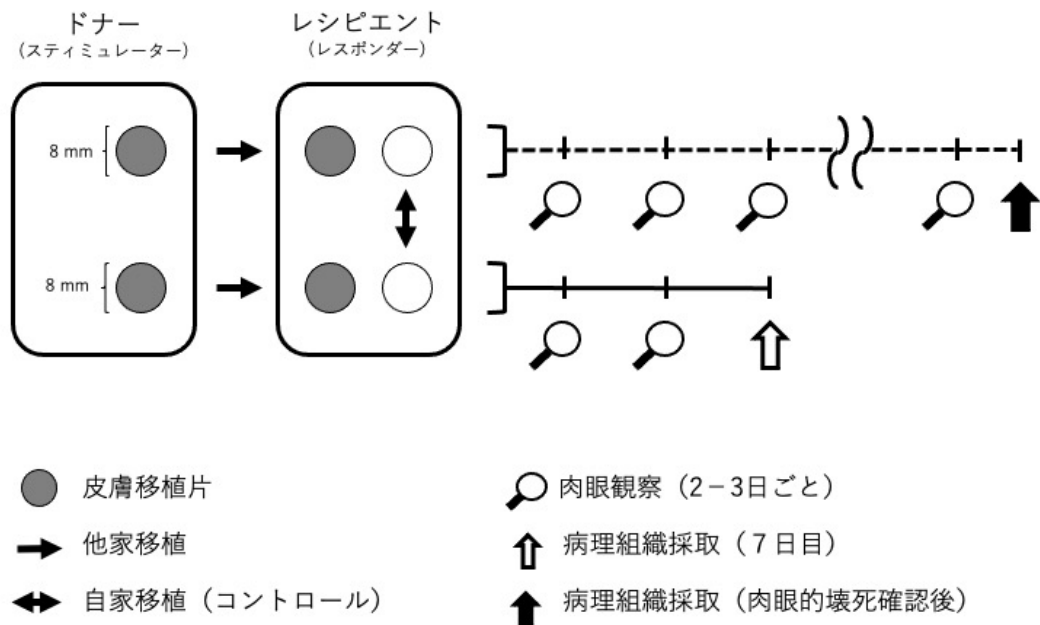


Fig. 3.2.1 ドナーおよびレシピエントにおける皮膚移植プロトコル

ドナーより 2 箇所 of 皮膚全層移植片を採取しレシピエントに移植した。自家皮膚移植はコントロールとしてレシピエントの他家移植部位に隣接して実施した。2 箇所の移植片のうち一方は移植 7 日目に生検し、他方の移植片は肉眼的な壊死が確認された時点で生検した。

| | ドナー (スタイミュレーター) | レシピエント (レスポンドー) | 血液交差適合試験 (主試験/副試験) |
|-------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Dog 1 | Dog 2 | - / - |
| Set 1 | Dog 1 | Dog 3 | - / - |
| | Dog 1 | Dog 4 (DEA 1.1 陽性) | - / - |
| | Dog 5 | Dog 6 | - / - |
| Set 2 | Dog 5 | Dog 7 (DEA 1.1 陽性) | - / + |
| | Dog 5 | Dog 8 (DEA 1.1 陽性) | - / + |

Table 2.2.2 実験に使用した犬の血液型および血液交差適合試験結果

犬赤血球抗原 (DEA) 1.1 に対して陽性を示した Set 1 の 1 頭 (Dog 4) および Set 2 の 2 頭 (Dog 7 および Dog 8) を除き、全ての犬が DEA 1.1 と DEA 1.2 に対し陰性であった。

| | ドナー (スタイエレット) | レシビエント (レスボンダー) | ハプロタイプ分類 | ミスマッチアレル数 | 刺激指数 | リンパ球浸潤 (7日目) | 病理組織学的壊死 (7日目) | 移植片生着期間 |
|-------|------------------|--------------------|----------|-----------|---------------|-----------------|-------------------|---------|
| | Dog 1 | Dog 2 | 完全一致 | 0 | 0.96 ± 0.29 | ± | - | 21 日間 |
| Set 1 | Dog 1 | Dog 3 | 半一致 | 1 | 0.99 ± 0.38 | + | - | 14 日間 |
| | Dog 1 | Dog 4 | 不一致 | 5 | *2.98 ± 0.31 | +++ | + | 11 日間 |
| | Dog 5 | Dog 6 | 完全一致 | 0 | 1.15 ± 0.38 | ± | - | 18 日間 |
| Set 2 | Dog 5 | Dog 7 | 半一致 | 4 | *2.57 ± 0.31 | ++ | + | 11 日間 |
| | Dog 5 | Dog 8 | 不一致 | 8 | **6.21 ± 0.47 | ++ | + | 11 日間 |

Table 2.2.3 各ビーグル犬のペアにおける刺激指数、移植7日目における病理組織学的所見および移植片生着期間

各ペアにおける刺激指数は完全一致ペアと統計学的に比較した。また、移植7日目におけるリンパ球浸潤は、最小(±)、軽度(+)、中程度(++)または重度(+++)としてスコアリングした。

* : P < 0.01、** : P < 0.001

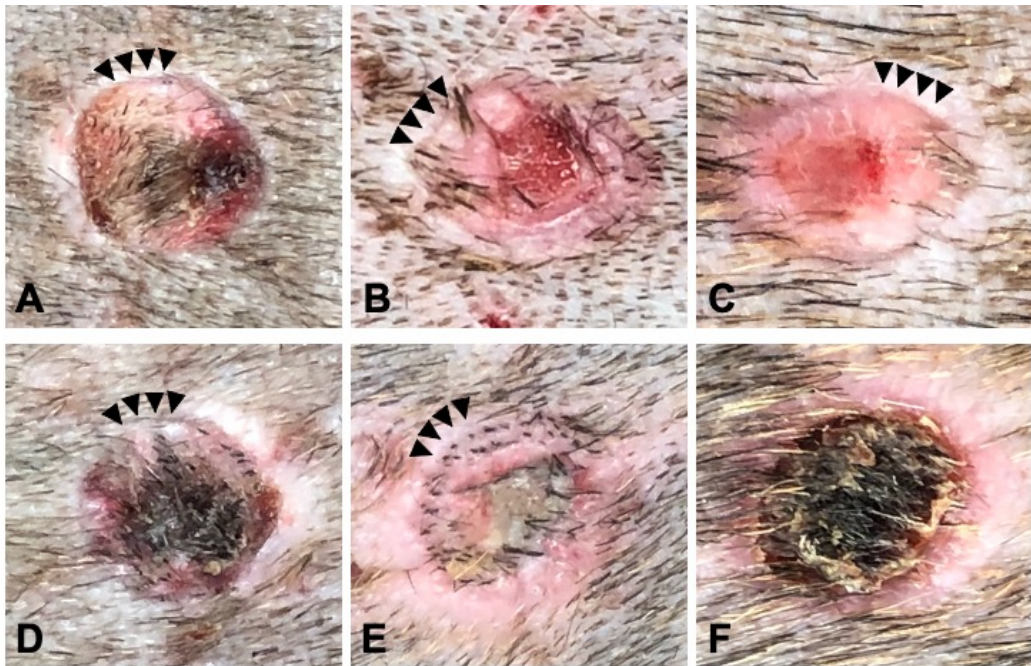


Fig. 3.2.2 主要組織適合性複合体 (MHC) 完全一致ペア (Set 2) のレシピエントにおける皮膚移植片の肉眼所見

自家移植片 (A-C) および他家移植片 (D-E) の双方で縫合手技により移植片の中央が損傷している。しかし、移植片辺縁は7日目 (A、D) および14日目 (B、E) で生着していることが確認された。自家移植片は18日目 (C) まで生着が認められた。一方、他家移植片は黒色化し、肉眼的に拒絶したと見なした (F)。

矢頭：生着した移植片の辺縁

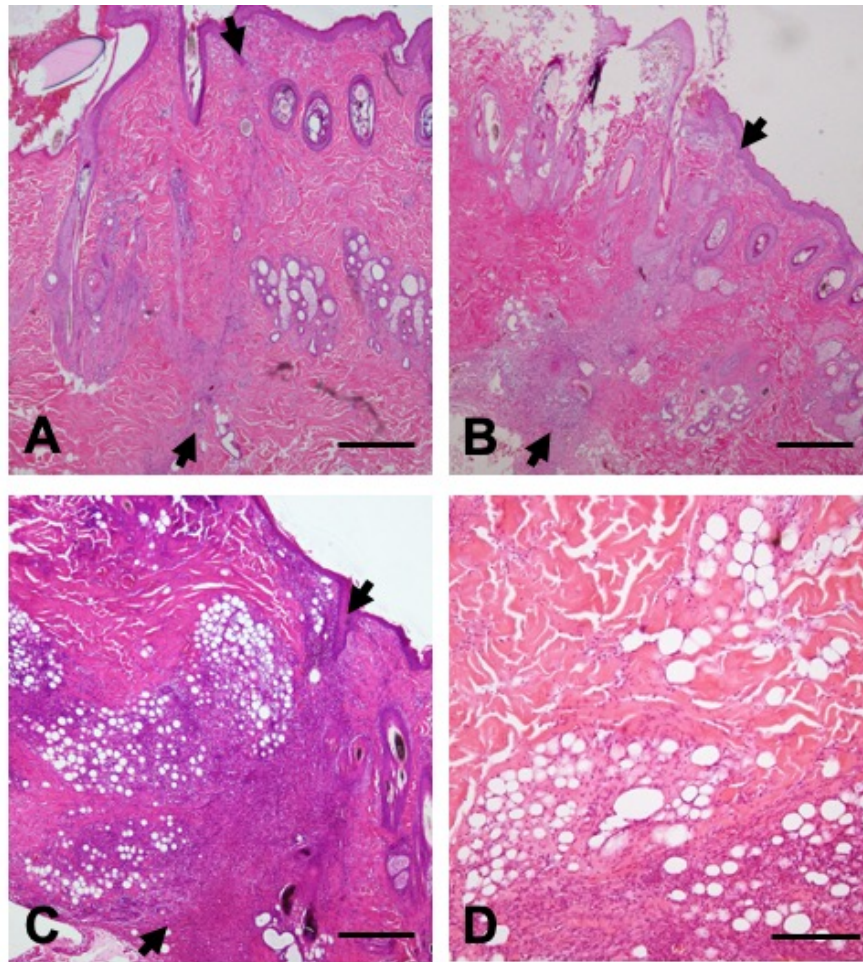


Fig. 3.2.3 移植7日目における他家移植片の病理組織学的所見（HE染色）

移植片境界は矢頭間の仮想線で表され、移植片は左側に存在する。主要組織適合性複合体完全一致ペアの移植片（A）は、半一致（B）および不一致ペア（C）と比較して、細胞浸潤が少なく境界が不明瞭である。不一致ペアは、移植片の壊死を伴う重度のリンパ球細胞浸潤を示した（D）。

Bar： 300 μ m（A-C）、200 μ m（D）

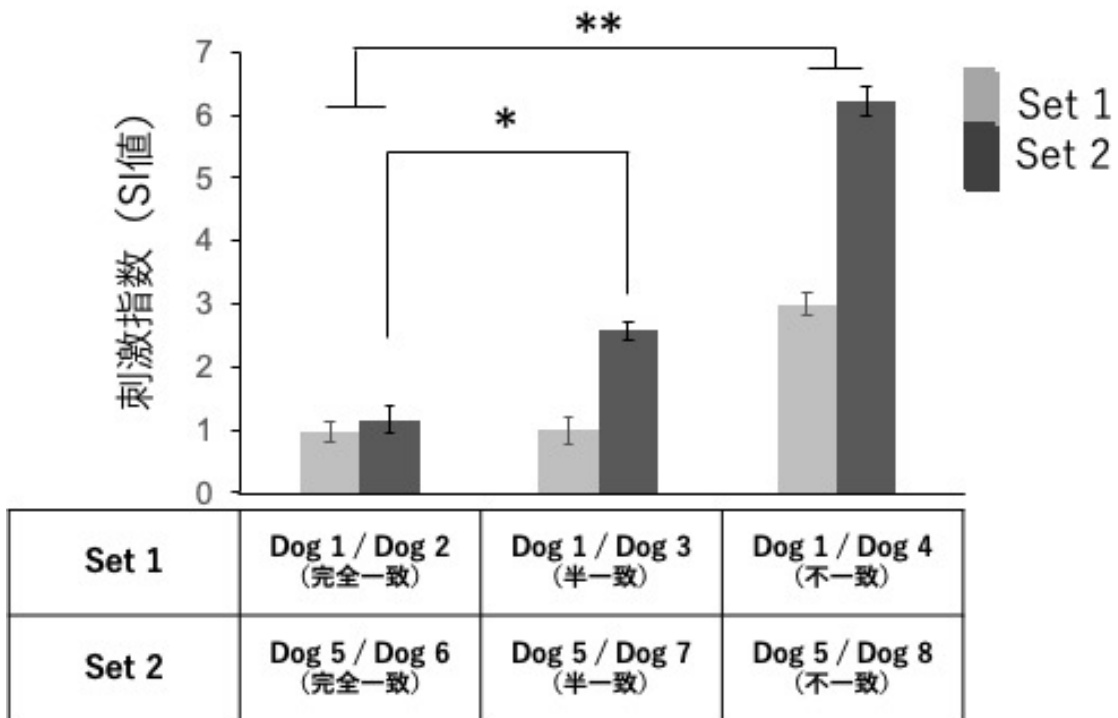


Fig. 3.2.4 Set 1 および Set 2 の各組み合わせにおける刺激指数 (SI 値)

各バーに CytoTell リンパ球混合反応 (MLR) による SI 値の平均±標準偏差を表した。グラフの下表は、MLR における各セットのドナーとレシピエントの組み合わせを表す。

* : $P < 0.01$ 、** : $P < 0.001$

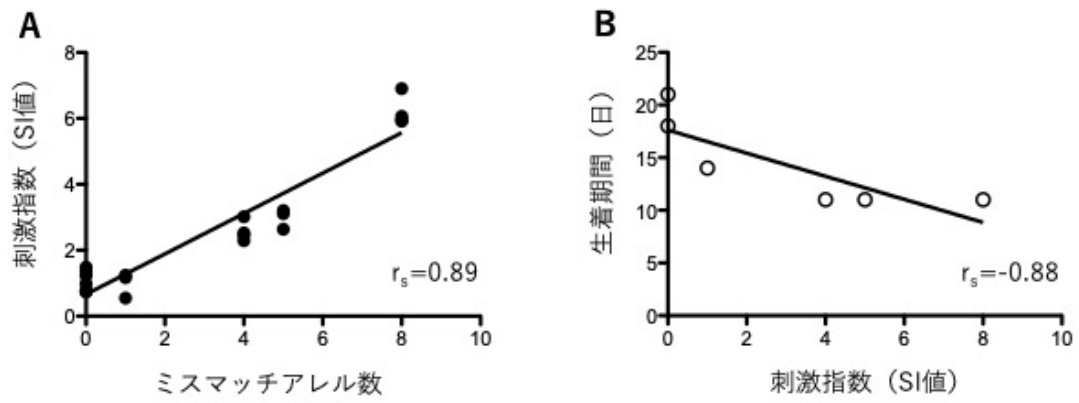


Fig. 3.2.5 ドナーおよびレシピエント間の刺激指数 (SI 値) とミスマッチアレル数との相関関係 (A) および移植片の生存期間と SI 値の相関関係 (B)

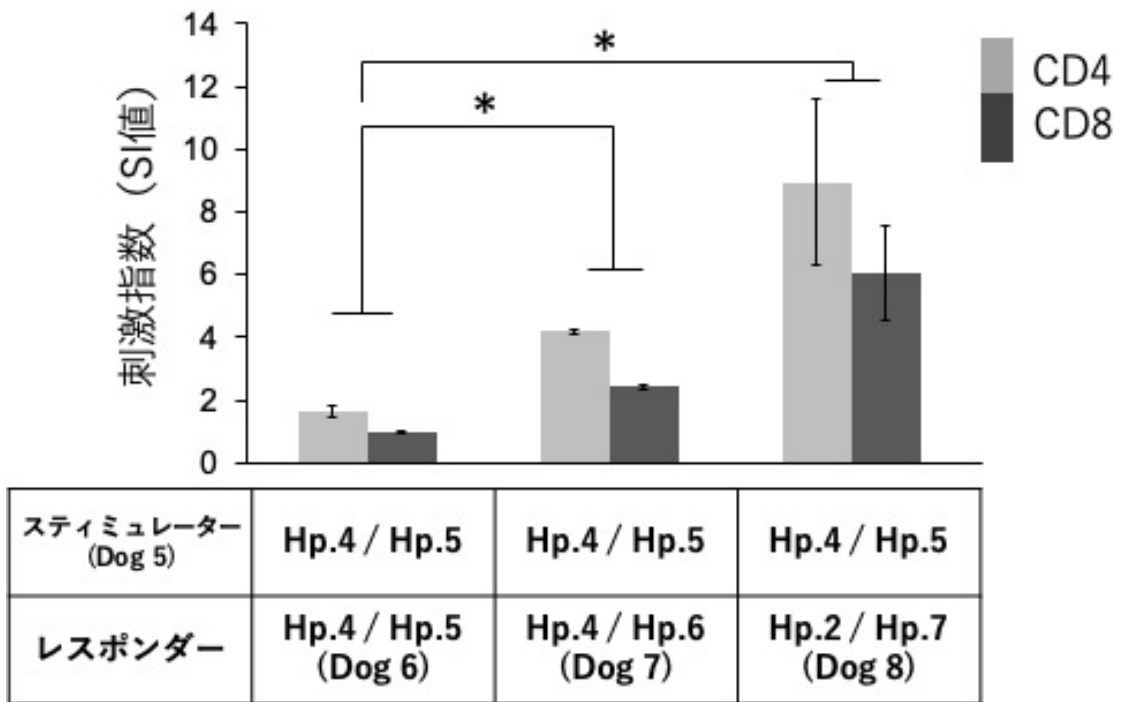


Fig. 3.2.6 Set 2 におけるアロ反応性 CD4 および CD8 陽性 T 細胞増殖

各バーに CytoTell リンパ球混合反応 (MLR) による CD4 または CD8 陽性 T 細胞の刺激指数 (SI 値) の平均±標準偏差を表した。グラフの下表は、MLR における各犬のハプロタイプ (Hp) の組み合わせを表す。

* : $P < 0.01$

第3章 臨床応用に向けた犬 DFAT の調整と 投与安全性の検討

第1節 細胞療法のための犬 DFAT の調整

1. 緒言

慢性肝炎は犬の一般的な肝疾患であり、その終末像である肝硬変にいたった場合には有効な治療法はなく、極めて予後が短い(Favier et al., 2013)。したがって、既存の治療に反応しない犬の肝硬変に対して細胞療法は効果の期待される治療法である。細胞療法に使用される細胞の中でも脱分化脂肪細胞(DFAT)は少量の脂肪組織から作製することが可能であり、栄養状態の悪い肝硬変の犬に対する治療候補として有用である。我々はこれまでに、犬 DFAT が 1g 未満の少量の脂肪組織から作製可能であり、犬の肝硬変の確定診断に多用される腹腔鏡検査と同時に組織を採取することで低侵襲に多量の DFAT が作製可能であることを明らかにした。また、犬 DFAT には主要な移植抗原である主要組織適合性複合体 (MHC) の mRNA 発現が認められることから他家移植を実施するためには免疫学的な障壁が存在する可能性が示された。したがって、詳細なシーケンスペースタイピングに基づいた MHC 型のマッチングを行うことで他家移植効率が向上する可能性を示し、犬 DFAT の自家および他家移植に関わる基本的な知見を収集した。しかし、実際に DFAT を犬に投与するためには、DFAT の調整や投与に関わる基礎的な情報が不足している。

DFAT を肝硬変の犬に臨床応用するためには、作製された DFAT を適切な細胞数に調整し、投与までの一定期間保管する必要がある。獣医学領域において細胞療法のソースとして期待される間葉系幹細胞 (MSC) の増殖能を評価する方法として倍加時間が使用されている。倍加時間の評価により必要な細胞数に至るまでの培養日数の推定が可能となり、投与に必要な組織量を推定できる

ことから臨床的に重要である (DePompeo et al., 2020)。また、MSC は投与に伴い、細胞直径の大小により細胞塞栓のリスクが存在する (Furlani et al., 2009; Ge et al., 2014)。さらに、MSC は投与にあたって調整を行う基剤や、保存温度、時間によって細胞の生存率が変動する (Fujita et al., 2020)。

これまでに犬 DFAT に関して、その増殖能や細胞直径、保存条件といった投与に必要な基礎的な検討を行なった報告はない。したがって、本節では犬 DFAT の投与に向けた増殖能と細胞直径および保存条件の検討を行なった。

2. 材料および方法

1) 犬 DFAT の作製

供試サンプルとして健常ビーグルの献体 5 頭に由来する腹腔内脂肪組織を使用した。使用した犬の年齢と体重の中央値はそれぞれ 2.3 歳齢 (範囲 : 2.3–2.8 歳齢) と 11.8kg (範囲 : 10.6–12.1kg) であった。すべての犬は無菌的に腹部正中切開により鎌状間膜を露出し、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織は直ちに滅菌 PBS 中に懸濁し、犬 DFAT の作製に供した。

犬 DFAT の作製は第 1 章と同様の方法で行なった。まず、脂肪組織の重量を計測し、付着している結合組織および血管を除去した後、コラゲナーゼ処理を行なった。次に、100 μ m 口径のフィルターで濾過し、100 g で 1 分間低速遠心分離した。浮遊した成熟脂肪細胞を採集後、20%FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン添加 DMEM で満たした 12.5 cm² 培養フラスコに播種し、天井培養を行なった。

作製した初代培養 DFAT (P0) はサブコンフルエントとなるまで培養したのち、倍加時間の測定および保存条件の検討に使用した。以降、20%FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン添加 DMEM を増殖培地として週に 2 回培地交換を行なった。

2) 倍加時間の測定

天井培養によって得られた DFAT (P0) を 6-Well 細胞培養ディッシュ (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) に 2×10^3 個/cm² の濃度で播種し、Passage 4 (P4) まで 7 日ごとに継代を行なった。継代ごとに血球計算版を用いて細胞数の測定を行った。倍加時間 (DT) は既報に従い、公式： $DT = t / \log_2 (N / N_0)$ を使用して計算した。ここで、 t は培養日数、 N は採取時の細胞数、 N_0 は播種した細胞数を表す (Peng et al., 2015)。また、各継代時点における浮遊 DFAT の細胞直径をデジタル顕微鏡カメラ (3R Solution Corp., Fukuoka, Japan) を使用して測定した。

3) 保存条件の評価

天井培養によって得られた DFAT (P0) を 60 mm 細胞培養ディッシュ (TPP Techno Plastic Products AG) に 2×10^3 個/cm² の濃度で播種し、Passage 2 (P2) まで継代した細胞を使用した。トリプシン処理し細胞を回収後、直ちに 2 種類の基剤 (0.9% 生理食塩水または乳酸リンゲル溶液) にて洗浄し、 $4-5 \times 10^5$ 個/ml の濃度に調整した細胞懸濁液を作製した。それぞれの基剤を使用した懸濁液は 2 つの 1.5 ml エッペンドルフチューブ (WATSON Bio Lab, Kobe, Japan)

に分注し、異なる温度（4°Cおよび室温）で保存した。生存率の算出はトリパンブルー染色法に基づき、細胞調整直後、保存1時間後、3時間後、6時間後および24時間後に測定した。

4) 統計処理

各種データは平均±SD で表した。継代ごとの倍加時間、細胞直径および生存率の比較には Paired-t 検定または Repeated measures ANOVA を使用し、Post hoc test として Tukey 検定を行なった。統計は GraphPad PRISM for Mac OS X version 5.0b にて解析し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

1) 倍加時間および細胞直径

Passage 1 (P1) から Passage 4 (P4) における倍加時間と P0 から P4 における細胞直径を Fig. 4.1.1 に示した。倍加時間は P3 以降急激に増加し、P3 および P4 の倍加時間 (12.8 ± 7.0 日および 21.6 ± 12.3 日) は P1 (2.3 ± 0.9 日) と比較して有意に延長した ($P < 0.05$ および $P < 0.01$) (Fig. 4.1.1A)。また、細胞直径は P0 と比較して継代ごとに増加し、P4 の細胞直径は $40.5 \pm 2.4 \mu\text{m}$ と P0 ($22.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$) と比較し約二倍に増加した (Fig. 4.1.1B)。

2) 保存条件の評価

各保存条件における生存率の推移を Fig. 4.1.2 に示した。各条件を比較すると、24 時間目の生存率はラクトリンゲル液室温保存が最も高く、 $88.5 \pm$

4.1%であった。また、ラクトリンゲル液室温保存条件では保存 3 時間目、6 時間目および 24 時間目の生存率が生理食塩水保存の 2 条件における同一保存時間と比較してそれぞれ有意に高い生存率を示した ($P < 0.05$)。さらに各保存条件における時間ごとの推移では、どの条件においても経時的に生存率が低下した。生理食塩水保存の 2 条件では保存 1 時間目より有意な生存率の減少がみられ、ラクトリンゲル液 4°C 保存では 3 時間目より減少がみられたが、ラクトリンゲル液室温保存条件においては 6 時間目に初めて有意な減少がみられ、最も長く生存率が維持されていた。

4. 考察

MSC を用いた細胞療法は人の肝硬変を対象とした臨床研究により治療効果が示されており、MSC と類似した血管新生作用や免疫調整作用を有する DFAT 療法は犬の肝硬変に対して期待が持てる新規治療法である。医学領域で使用される MSC の体重当たりの細胞数は $1.0\text{--}2.0 \times 10^6$ 個/kg であり、 1.2×10^7 個/kg を超えない(Zhang et al., 2020)。犬の肝障害において MSC を使用した報告では $0.4\text{--}2.0 \times 10^6$ 個/kg の細胞数が使用されており、概ね人と一致している(Matsuda et al., 2017; Nam et al., 2017; Teshima et al., 2017; Fang et al., 2018 a; Gardin et al., 2018; Nishimura et al., 2019; Yan et al., 2019)。重篤な肝疾患を患う犬にとって至適細胞数への増殖を待つことは負担となり、特に自家由来細胞を使用する際には組織採取に侵襲を伴うことから、培養と増殖にかかる時間や必要組織量を正確に把握することは重要である。一般的に犬 MSC の倍加時間は 2–5 日とされており、高い自己複製能を有する。この高い増殖能は MSC の細

胞学的特徴であるとともに、細胞培養に要する日数や必要組織量、さらには初代培養細胞の数量から将来投与可能となる回数の予測に必要な指標となる (DePompeo et al., 2020)。DFAT は MSC 同様、いずれの動物種においても高い増殖活性を有するが、動物種によりその倍加時間はそれぞれ、人で 3 日、猫で 2 日、ウマで 3–5 日、豚で 0.9 日、マウスで 0.8 日と幅がある (Matsumoto et al., 2008; Kono et al., 2014; Peng et al., 2015; Murata et al., 2016)。本研究では初めて犬 DFAT の増殖能を調査し、その倍加時間が P1 および P2 において 2.3–3.1 日と高いことを明らかにした。しかし、急激な倍加時間の延長が P3 以降に認められた。一般に MSC の分裂回数は有限であり、継代に使用するトリプシンが細胞毒性を有することから継代に伴い細胞老化を引き起こし、倍加時間や細胞直径は増加する (Bertolo et al., 2015; Truong et al., 2019)。したがって、第 1 章で得られたデータを用い、高い増殖活性を維持する P2 の細胞を臨床応用することを想定すると、わずか数 mg/kg の脂肪組織から一回分に相当する治療用量の DFAT を作製可能であることが明らかとなった。

DFAT を犬の肝硬変に臨床応用するためには投与に関わる安全性や投与に関わるリスクを評価する必要がある。特に、MSC は細胞直径が細胞塞栓のリスクと関連することが実験動物モデルにおいて明らかとなっている (Furlani et al., 2009; Ge et al., 2014)。MSC の細胞直径は約 30 μm であり、白血球と比較して 2–3 倍大きく、毛細血管を通過できない。したがって、特に末梢静脈経路で細胞を投与した場合、多くの細胞が肺の毛細血管 (約 14 μm) にトラップされる (Voga et al., 2020)。Furlani らは蛍光標識した MSC を生体顕微鏡観察下で

追跡し、細胞塞栓に伴う血流速の減少を確認した(Furlani et al., 2009)。また、Geらは人胎盤由来 MSC を細胞直径ごとにソーティングした上でラットの頸動脈から投与し、細胞直径と脳梗塞の発生リスクを検証した。その結果、直径が大きい細胞を投与された群では全ての動物に重篤な脳梗塞を引き起こし、2割の動物が死亡した。一方、直径が小さい細胞を投与された群では脳梗塞の程度は軽微であった(Ge et al., 2014)。したがって、投与する細胞の直径は細胞療法の安全性に直結する。今回、犬 DFAT の細胞直径は P1 および P2 において 30 μ m 以下であり、MSC と類似していることが明らかとなった。また、MSC と同様に継代に伴い細胞直径が増加した(Bahamondes et al., 2017)。したがって、DFAT を犬に投与する場合には細胞直径が小さく、増殖能の維持される P2 までの若い継代の細胞を使用する必要があることが明らかとなった。

DFAT を臨床応用する場合、採取した脂肪組織を実験室で培養および調整し、実際に投与が行われる病室へ細胞を輸送する必要がある。細胞療法を臨床応用するための課題の一つとしてこの輸送期間中に細胞の生存を確保することが挙げられ、アメリカ食品医薬品局は細胞療法に使用する際のクライテリアとして >70% の細胞生存率を求めている (<http://www.fda.gov>)。MSC では細胞の生存率を向上させるため、細胞浮遊液に使用する基剤や保存温度の調整が行われている。人骨髄由来 MSC を生理食塩水および 5% デキストロース溶液に保存した場合、生理食塩水が生存率保持に優れ、保存温度にかかわらず 2 時間以内の使用が勧められている(Sohn et al., 2013)。また、人 ASC では生理食塩水とラクトリンゲル液を比較した場合、保存 24 時間後の生存率がラクトリンゲル液で有

意に高い(Fujita et al., 2020)。一方、同一保存条件下で人および犬 ASC を比較した場合、犬 ASC でより生存率が維持される。したがって、至適保存条件には動物種差が存在し、犬由来の細胞を用いた研究が必要である(Gardin et al., 2018)。Bronzini らは犬 ASC を PBS と DMEM を基剤とし、複数の温度条件下で生存率を比較したところ、PBS 室温保存条件で 9–12 時間、細胞生存率が維持されると報告している(Bronzini et al., 2012)。しかし、PBS は研究用試薬であることから臨床現場で使用する場合には倫理的な懸念がある。また、DFAT について同様に保存条件の検討した報告はない。したがって、本研究では安全に細胞投与が行われた犬の *in vivo* 研究に基づき、保存基剤として生理食塩水とラクトリンゲル液を選択した(Kim et al., 2015, 2020; Spriet et al., 2015; Teshima et al., 2017)。その結果、各保存条件において犬 DFAT は高い生存率を示したが、室温でラクトリンゲル液に保存した場合に最も高い生存率が得られた。ラクトリンゲル液は生理食塩水と比較し、よりイオン組成が生理的であり、pH 緩衝作用を有することから高い生存率を得られた可能性が示された(Fujita et al., 2020)。また、低温により細胞障害が誘導されることから室温条件が 4°C 条件と比較し条件として適する可能性が示された(Rauen et al., 2007)。

5. 小括

本研究の結果から、犬 DFAT の投与には高い増殖能を有し、細胞直径の小さい Passage 2 以内の細胞をラクトリンゲル液に調整し、室温保存にて投与することが望ましいと考えられた。

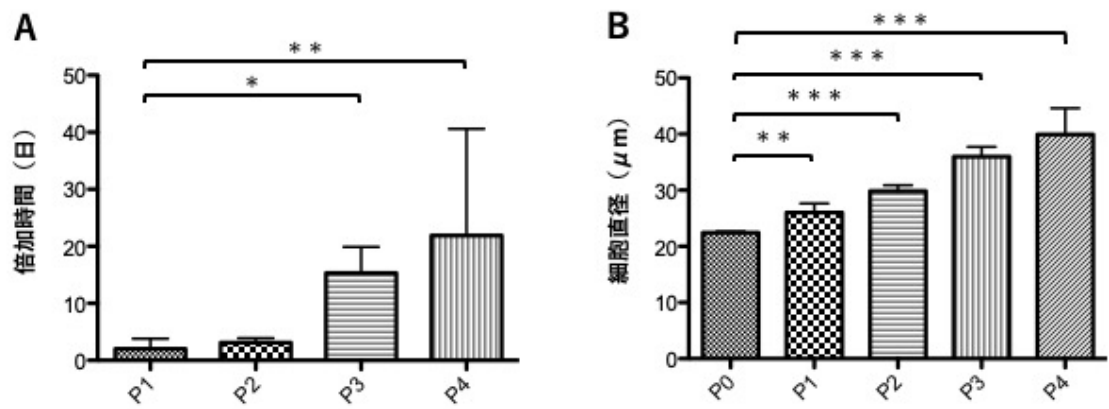


Fig. 4.1.1 犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) の Passage 1 (P1) から Passage 4 (P4) における倍加時間 (A) と Passage 0 (P0) から P4 における細胞直径 (B)

* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.001$

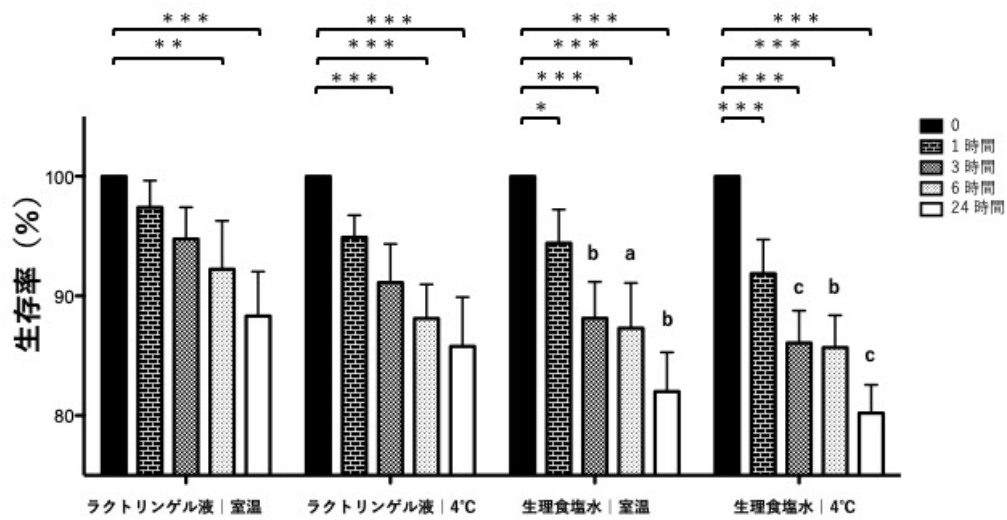


Fig. 4.1.2 犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) の各種保存条件における生存率

* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.001$

a : 同一時点におけるラクトリンゲル液室温保存との比較 ($P < 0.05$)

b : 同一時点におけるラクトリンゲル液室温保存との比較 ($P < 0.01$)

c : 同一時点におけるラクトリンゲル液室温保存との比較 ($P < 0.001$)

第3章 臨床応用に向けた犬 DFAT の調整と 投与安全性の検討

第2節 犬 DFAT の末梢静脈および門脈投与の安全性

1. 緒言

犬の肝硬変に対する有効な治療法はなく、極めて予後が短いことから (Favier et al., 2013)、間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞療法に期待が高まっている。MSC 療法は犬肝障害モデルを用いた複数の研究において臨床症状や血液生化学的所見の改善に加え、病理組織学的に炎症や線維化の改善効果が認められている (Matsuda et al., 2017; Teshima et al., 2017; Fang et al., 2018 a; Nishimura et al., 2019; Yan et al., 2019)。しかし、MSC は採取に侵襲を伴う骨髄や多量の組織量を必要とする脂肪組織を由来とすることから、麻酔リスクが高く栄養状態の悪い肝硬変の犬では十分な治療用細胞数を得られない可能性がある。一方、脱分化脂肪細胞 (DFAT) は少量の脂肪組織から作製することが可能であり、栄養状態の悪い肝硬変の犬に対する治療候補として有用である。また、DFAT は血管新生作用や免疫調整作用を有することから、これまでに齧歯類を用いた研究において心筋梗塞や膀胱損傷、脊髄損傷による運動機能障害、炎症性腸疾患など、種々の組織修復および疾患モデルに対し有効性が示されている (Jumabay et al., 2009; Sakuma et al., 2009; Nakayama et al., 2017; Ishioka et al., 2020)。したがって、現時点で有効な治療法が存在しない犬の肝硬変に対する新規治療法として期待が持てる。これまでに我々は腹腔鏡を応用することで低侵襲にかつ少量の脂肪組織から犬 DFAT を多量に作製可能であることを明らかにし、投与に関わる増殖能や細胞直径、保存条件など基本的な情報を集積した。その結果、犬 DFAT は高い増殖能を有し、細胞直径の小さい Passage 2 までの細胞をラクトリンゲル液に室温保存し、投与するべきであることが明らかとなった。

DFAT を実際に犬の肝硬変に臨床応用するためには DFAT の投与により生じる副作用を評価する必要がある。これまでの細胞療法に関する研究では、移植経路に応じて移植後の心筋梗塞や塞栓症などの有害反応の発生が報告されている (Vulliet et al., 2004; Tatsumi et al., 2013; Kang et al., 2014)。さらに、全身投与された細胞の多くは肺でトラップされることから細胞療法の有効性を減少させる恐れがある (Eggenhofer et al., 2012; Spriet et al., 2015; Teshima et al., 2017)。しかし、これまでに犬に対して DFAT を投与した報告はなく、異なる投与経路ごとの安全性が評価されていない。

したがって、本節では肝硬変の犬に対して DFAT を投与することを想定し、腹腔鏡により採取した脂肪組織由来の自家 DFAT を末梢静脈および門脈より投与し、短期的な副作用の有無を解析した。

2. 材料および方法

1) 腹腔鏡下脂肪採取および犬 DFAT の作製

供試動物として健常ビーグル5頭を使用し第1章と同様の方法で脂肪組織の採取と DFAT の作製を行った。使用した犬の年齢と体重の中央値はそれぞれ 3.4 歳齢 (範囲: 2.8–3.5 歳齢) と 12.1kg (範囲: 10.6–14.4kg) であった。また、すべての犬は血液検査、腹部超音波検査の結果に基づいて基礎疾患がなく、健常であることを確認した。

腹腔鏡下脂肪組織採取は全身麻酔下で実施した。全身麻酔はアトロピン塩酸塩 (0.04 mg/kg, S.C.) および酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) に

より前投与を行い、プロポフォール (7 mg/kg, I.V. to effect) により麻酔導入した。導入後、気管挿管を行い、イソフルランにより麻酔維持を行なった。術後鎮痛及び感染症対策として酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) およびセフォベシン (8 mg/kg, S.C.) の投与を行なった。

全身麻酔下で術野の無菌処置とドレーピングを行い、犬を左側横臥位に保定した。気腹は閉鎖式で実施し、気腹針を刺入後 CO₂ ガスにより気腹を行なった。完全な気腹を確認後、右側体壁および腹部正中より加えた小切開より2本のトロッカーカニューレを刺入した。次に直径 5 mm の腹腔鏡カメラを用いて腹腔内を探索後、鏡視下で大網脂肪組織を確認し、直径 5 mm の生検鉗子を用いて脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織は、培養のために PBS に直ちに懸濁した。

採取した脂肪組織の重量を計測し、付着している結合組織および血管を除去した後、コラゲナーゼ処理した。次に、100 μ m 口径のフィルターで濾過し、100 g で1分間低速遠心分離した。浮遊した成熟脂肪細胞を採集後、20% FBS 添加 DMEM で満たした 12.5 cm² 培養フラスコに播種し、天井培養を行なった。作製した DFAT はサブコンフルエントとなるまで培養したのち、トリプシン EDTA 処理を施し、Passage 1 (P1) まで継代培養した。DFAT (P1) は細胞凍結保存液 (Zenogen Pharma Co., Ltd., Fukushima, Japan) 中に回収し、投与までの期間、液体窒素中に凍結保存した。

2) 投与用 DFAT の調整

凍結保存した DFAT (P1) は投与前に 37°C で速やかに融解し、75 cm²

細胞培養フラスコ (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Tokyo, Japan) に播種した。サブコンフルエントまで培養した P2 の細胞を回収し投与に使用した。回収した DFAT は PBS で少なくとも 3 回洗浄し、移植のために 1×10^6 個/kg の濃度で懸濁液を作製した。前節の結果からすべての犬について自家 DFAT をラクトリンゲル液中に懸濁し、投与直前まで室温で保管した。

3) DFAT の末梢静脈および門脈投与

DFAT の投与プロトコルを Fig. 4.2.1 に示した。すべての犬において末梢静脈および門脈投与を行い、各投与経路間には 4 週間以上のインターバルを設けた。

3.1) DFAT の末梢静脈投与

末梢静脈投与では橈側皮静脈に留置針を設置し、覚醒下で微量持続点滴ポンプ (Terumo Co., Tokyo, Japan) を用いて 30 分間かけて投与した。

3.2) DFAT の門脈投与

門脈投与は過去の報告を参照 (Sakamoto et al., 2012) し、以下の手順で全身麻酔のもと門脈本幹に投与した。

全身麻酔はアトロピン塩酸塩 (0.04 mg/kg, S.C.) および酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) により前投与を行い、プロポフォール (7 mg/kg, I.V. to effect) により麻酔導入した。導入後、気管挿管を行い、イソフルランにより麻酔維持を行なった。術後感染症対策としてセフォベシン (8 mg/kg, S.C.) を投

与した。

次に、全身麻酔下で術野の無菌処置とドレーピングを行い、犬を仰臥位に保定した。超音波ガイド下(FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan)で脾門部および脾静脈を描出後、16 ゲージの留置針 (Terumo Co.) を経皮的に脾実質に刺入した。留置針が脾静脈内に到達したことを超音波ガイド下で確認し、ガイドワイヤー(Cook Medical Japan G.K., Tokyo, Japan)を脾静脈から門脈に挿入した。ガイドワイヤーを利用し、ヘパリン加生理食塩水で満たした 18G ダブルルーメン中心静脈用カテーテル(Terumo Co.)を門脈内へ設置した。カテーテルの先端が門脈本幹に配置されていることを X 線透視装置(GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)下で確認し、トランスデューサー(FUKUDA COLIN Co., Tokyo, Japan)を使用して門脈圧 (PVP) を測定した。留置したカテーテルの 2 つのポートのうち、一方は経時的な PVP 測定のためにトランスデューサーに接続され、他方は DFAT 移植に使用した。DFAT は用手により 3 分間かけて投与した。

4) DFAT 投与後の安全性評価

4.1) 身体検査、血液凝固検査および門脈圧測定

すべての犬について自家 DFAT 投与前および投与後 1 日目と 7 日目に身体検査と血液凝固検査を実施した。身体検査項目として体温、心拍数、呼吸数および血中酸素飽和度を測定した。また、血液凝固検査として、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、血漿フィブリノーゲン濃度、アンチトロンビン活性、フィブリノーゲン分解産物および D-ダイマーを測定した。

PVP は門脈投与前および DFAT 投与終了から 20 分間にわたり 5 分間隔で測定した。

4.2) CT 血管造影検査

末梢投与および門脈投与の双方で移植直後 (30 分以内) および 7 日目に腹部および胸部の CT 血管造影検査 (Computed tomographic angiography: CTA) を行なった。

CTA は全身麻酔下で人工呼吸管理のもと実施した。全身麻酔はアトロピン塩酸塩 (0.04 mg/kg, S.C.) および酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg, I.V.) により前投与を行い、プロポフォール (7 mg/kg, I.V. to effect) により麻酔導入した。導入後、気管挿管を行い、イソフルランにより麻酔維持を行なった。次に犬を腹臥位に保定し、320 列マルチスライス CT (Canon Medical Systems) を使用して撮影した。造影剤としてイオヘキソール (Teva Pharma Japan Inc., Nagoya, Japan) を 2.5 ml / kg (750 mg I / kg) の用量で投与し、すべての撮影は陽圧換気下で過去の報告を参照し三相造影した (Sato et al., 2020 a)。

4) 統計処理

各種データは平均 ± SD で表した。各種データの比較には Repeated measure ANOVA を使用し、Post hoc test として Tukey 検定を行なった。統計は GraphPad PRISM for Mac OS X version 5.0b にて解析し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

末梢投与中、すべての犬が終始落ち着いており、DFAT 投与は動物の行動に変化を引き起こさなかった。また、いずれの投与経路においても自家 DFAT 投与後に顕著な臨床症状は認められず、体温、呼吸数、心拍数および血中酸素飽和度は 1 頭を除き基準範囲内であった。一方、末梢投与を行なった 1 頭が投与 1 日目に軽度の発熱 (39.2 °C) を呈した。この犬の体温は 2 日目までに正常化 (38.0 °C) し、他の身体検査所見に異常は見られず、臨床症状は認められなかった。

PVP は全 5 頭中 4 頭で 20 分間経時的に測定した。投与直前の平均 PVP は 5.8 ± 1.0 mmHg であった。また、DFAT 投与以降の各時点で統計学的有意差は見られず、門脈圧の変動は各犬で 1 mmHg 以内だった (Table 4.2)。

末梢静脈投与後の血液凝固検査所見は、投与 1 日目のアンチトロンビン活性 ($158.6 \pm 5.8\%$) が、投与前のアンチトロンビン活性 ($148.8 \pm 12.6\%$) と比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$)。また、門脈投与後の血液凝固検査所見は、投与 7 日目の血漿フィブリノーゲン濃度 (226.5 ± 41.0 mg/dl) が、投与前 (181.8 ± 36.8 mg/dl) と比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$)。さらに、投与 7 日目のアンチトロンビン活性 ($158.0 \pm 17.9\%$) は、投与前 ($146.2 \pm 21.0\%$) と比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$)。これら統計学的に有意に変動が認められた測定項目を含め、すべての血液検査結果は基準範囲内であった。投与直後および投与 7 日目の CTA では、肺血栓塞栓症や門脈塞栓の兆候がいずれの犬においても認められなかった (Fig. 4.2.3)。

4. 考察

犬の慢性肝炎は一般的な炎症性肝疾患であり、グルココルチコイドやシクロスポリンを用いた治療が行われる。しかし、慢性肝炎の終末像である肝硬変に至った場合、既存の治療に対する反応性に乏しく極めて予後が悪い(Favier et al., 2013)。したがって、既存の治療に代わる新規治療法の開発が極めて重要である。医学領域において肝硬変に対する有効な治療法は生体肝移植に限られることから、新規治療法として細胞療法に期待が高まっている。特に、MSCは簡単に培養可能で、倫理的な問題が少ないことから肝硬変の人を対象とした臨床研究が実施されている(Suk et al., 2016; Liang et al., 2017; Fang et al., 2018 b)。しかし、MSCの主要な細胞源である骨髄や脂肪組織は採取にかかる侵襲や必要とする多量の組織量が問題視されている。一方、DFATは高い増殖能と多分化能、血管新生作用や免疫調整作用を有することからこれまでに心筋梗塞や膀胱損傷、脊髄損傷による運動機能障害、炎症性腸疾患など、種々の組織修復および疾患モデルに対して有効性が示されている(Jumabay et al., 2009; Sakuma et al., 2009; Nakayama et al., 2017; Ishioka et al., 2020)。また、少量の組織から多量の細胞を調整可能である点から、栄養状態が悪く、脂肪組織量の少ない肝硬変の犬に適した細胞療法のソースであると考えられる。これまでに我々は犬DFATが少量の組織から低侵襲に採取できることを示し、投与に関わる増殖能や細胞直径、保存条件など基礎的な情報を集積した。医学領域の細胞療法では複数の投与経路が報告されており、特に末梢静脈投与と門脈投与が汎用される。しかし、これまでに犬DFATを投与し、その安全性を評価した報告はない。したがって、本研究では犬の肝硬変に対するDFATの臨床応用を目的として自家犬DFATを

複数の経路より投与し、安全に投与可能であることを明らかにした。

肝硬変の人に対して汎用される投与経路のうち、末梢静脈投与は最も侵襲が少なく簡便な投与経路であるが、投与された細胞の多くが肺にトラップされる。肺でトラップされた細胞は急速に排除されることから、他の投与経路と比較して肝臓への細胞定着率が低い(Eggenhofer et al., 2012; Spriet et al., 2015)。一方、門脈投与は直接肝臓へ接続する脈管への投与が可能であることから細胞の肝臓への定着率は高い。犬 ASC をテクネチウムシンチグラフィを用いて追跡を行った場合、末梢静脈投与した細胞の 85%は肺に分布するが、門脈投与では 86%が肝臓に分布する。また、末梢静脈投与した細胞は投与 6 時間後においてもわずか 11%のみが肝臓に到達する(Spriet et al., 2015)。犬の CCl₄誘導肝障害モデルでは、末梢投与と比較して門脈投与において肝臓の炎症および線維化などの病理組織学的指標や血液生化学的所見に改善が認められる(Teshima et al., 2017; Nishimura et al., 2019)。したがって、細胞の定着率と効果から肝硬変に対する細胞療法には門脈投与が勧められる。一方、マウス肝硬変モデルでは末梢投与の改善効果が門脈投与と比較して高く、医学領域における多くの臨床研究から末梢投与による効果が認められている(Kim et al., 2011; Yang et al., 2020)。さらに、進行した犬の肝硬変では門脈圧亢進症に伴う後天性門脈体循環短絡が認められることから、門脈投与を行った細胞が短絡血管により末梢循環へ移行し、結果として肺に血栓を形成することが危惧される(Muraca et al., 2002)。したがって、本研究では進行した犬の肝硬変を対象として DFAT の投与を行うことを想定し、末梢投与および門脈投与の安全性を評価した。

自家細胞療法において最も危惧される副作用は投与に伴う細胞塞栓および血栓形成である。本研究では DFAT 投与に伴う血栓形成のリスクを評価する目的で血液凝固検査および CTA を実施した。血液凝固検査は簡便なスクリーニング検査として血栓形成の兆候を反映し (Song et al., 2016)、CTA は肺血栓塞栓症や門脈血栓に対して有用性が高い (Goggs et al., 2014; Sato et al., 2020 a)。本研究から、犬自家 DFAT の末梢投与により、全ての犬の血液凝固検査は正常範囲内であり CTA の結果から肺血栓塞栓の兆候を示さなかった。MSC の末梢投与により細胞の多くが肺血管系によりトラップされ、塞栓症のリスクを伴う。マウスを用いた研究では全身投与を受けた動物の 25–40% が肺塞栓症で死亡した (Furlani et al., 2009)。また、細胞による物理的閉塞のほか、マウス由来 ASC の細胞表面には組織因子が高度に発現し、ASC を投与された動物の血液凝固カスケードを活性化する (Tatsumi et al., 2013)。この研究では、体重あたりの静脈内投与細胞数は本研究とほぼ同一であり、末梢投与 24 時間以内の致死率は 85% であった (Tatsumi et al., 2013)。さらに、医学領域では自家 ASC を投与され、CTA により容易に確認できる大型の肺血栓塞栓症を生じている (Jung et al., 2013)。本研究から、犬 DFAT の自家末梢投与により投与 7 日目まで重篤な副作用は認められず、血液凝固検査や CTA により検出可能な血栓は確認されなかったことから安全な投与経路であると考えられた。

末梢投与に加えて、本研究から自家 DFAT の門脈投与後に門脈圧亢進もしくは門脈血栓を形成した犬は認められなかった。細胞療法において、末梢投与

された細胞の多くが肺循環にトラップされることから、肝疾患患者に対しては門脈投与が理想的な経路と考えられている (Spriet et al., 2015; Teshima et al., 2017)。門脈経路の細胞投与に懸念される重大な合併症は門脈圧亢進と門脈血栓形成であるが、これまでに犬を対象とした細胞療法の研究においてこれらの合併症に関する情報は限られている。特に、犬に対して門脈経路で MSC を投与し、経時的に門脈圧の推移を測定した報告はない。犬の経門脈肝細胞移植モデルでは高用量の単離肝細胞が移植され、門脈圧が 3–4 倍に増加した。この研究ではすべての犬で病理組織学的な微小門脈血栓が確認された (Kocken et al., 1996)。また、門脈を介して移植された犬肝臓オルガノイドは門脈圧を最大 1.9 倍まで上昇させる (Kruitwagen et al., 2020)。さらに、慢性肝疾患の人に対する臨床研究では幹細胞の門脈投与後、腹部超音波検査において検出可能な大型の門脈血栓が形成された (Coppin et al., 2020)。上述の研究において投与された細胞数は 3×10^6 個/kg から 8×10^7 個/kg であり、本研究による投与細胞数と比較し高用量である (Kocken et al., 1996; Coppin et al., 2020; Kruitwagen et al., 2020)。したがって、本研究における合併症発生率の低さは、過去の報告と比較して投与された細胞数が影響した可能性がある。本研究では犬に対して門脈経路で細胞を投与し、初めて経時的に門脈圧を評価した結果、圧変動は観察されなかった。また、血液凝固検査や CTA により血栓形成の兆候が認められず、本研究で使用した投与細胞数や投与速度などのプロトコルを使用することで犬 DFAT の門脈投与が安全であることを明らかにした。

本研究で確認された唯一の副作用は、末梢投与を行なった際に 1 頭で認

められた軽度の一過性発熱である。理論的に自家移植では、免疫関連の副作用は最小限であり、安全であると考えられる。複数の臨床研究から自家 MSC 投与を受けた人の一般的な有害事象として軽度の一過性発熱が報告されている (Zhang et al., 2020)。また、猫の自家 MSC 投与では、呼吸促拍や尿失禁、嘔吐、無関心などの即時型の副作用が投与速度依存性に発生する (Arzi et al., 2016)。自家投与に関するこれらの副作用の原因についていずれの報告においても未検証であるが、これまでに培養に使用される異種蛋白である FBS に対する免疫応答が副作用の原因になりうると指摘されている (Selvaggi et al., 1997)。

本研究にはいくつかのリミテーションが存在する。まず、研究対象に DFAT 投与を受けていない対照群が倫理的な理由から含まれていない。したがって、CTA 評価のための麻酔薬や門脈投与の手技など、研究結果に影響を与える要素の影響を排除することができない。また、DFAT の単回投与のみを受けた犬が研究に含まれた。これまでに細胞療法で使用される至適細胞用量について統一化されたプロトコルはなく、種々の用量で研究が行われているのが現状である (Gugjoo et al., 2019)。また、複数の研究から MSC の複数回投与が有効であることが示されているため、投与回数に関する検討が必要がある (Nam et al., 2017; Gardin et al., 2018)。さらに、本研究は投与後短期間しか観察されなかったため、長期的な副作用に関する調査が必要である。犬への DFAT 投与の安全性を正確に評価するためには、長期の追跡調査を伴う DFAT の複数回投与の影響を評価する研究が必要となる可能性がある。

本研究で観察された唯一の副作用は軽微であった。本研究より自家 DFAT の単回投与は末梢投与および門脈投与ともに短期的な安全性が高く、十分に犬の肝硬変に対して応用可能であると考えられた。

5. 小括

本研究から DFAT は肝硬変の犬を想定した腹腔鏡下脂肪組織採取から作製可能であり、作製された自家犬 DFAT は末梢静脈および門脈経路によって安全に投与できることが示された。

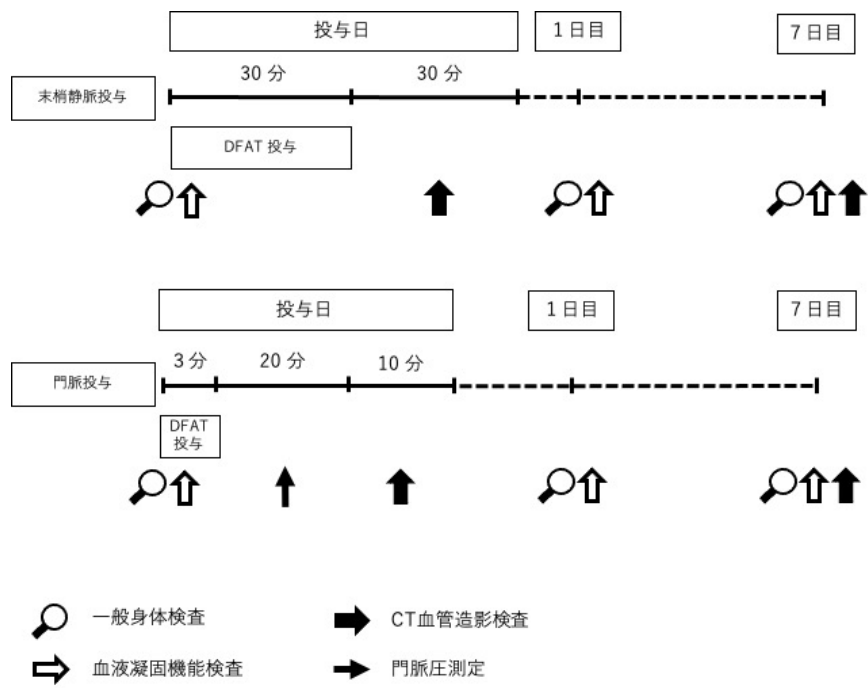


Fig. 4.2.1 犬脱分化脂肪細胞 (DFAT) の末梢静脈および門脈投与と安全性評価
 プロトコル

| 個体番号 | 門脈圧 (mmHg) | | | | |
|-------|------------|---------|---------|---------|---------|
| | 投与前 | 5 分後 | 10 分後 | 15 分後 | 20 分後 |
| 1 | 5.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 5.0 |
| 2 | 6.0 | 6.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| 3 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| 4 | 5.0 | 6.0 | 5.0 | 6.0 | 6.0 |
| 平均±SD | 5.8±1.0 | 6.3±0.5 | 6.3±1.0 | 6.5±0.6 | 6.3±1.0 |

Table 4.2 犬脱分化脂肪細胞の門脈投与に伴う各個体における門脈圧の推移

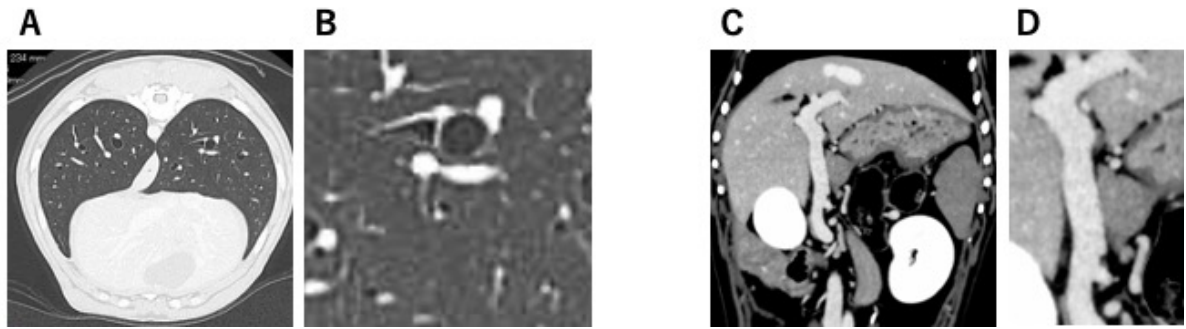


Fig. 4.2.2 犬脱分化脂肪細胞の末梢静脈投与後の胸部 CT 画像 (A、B) および門脈投与後の腹部 CT 画像 (C、D)。

第4章 総括

本研究では、犬の難治性肝疾患である肝硬変に対し、既存の治療に代わる新規治療法として DFAT の臨床応用に向けた検討を実施した。

肝硬変を疑う犬では腹腔鏡検査による肝生検と確定診断を行い、既存の治療に抵抗性を示す場合には治療に苦慮していた。また、栄養状態の悪い肝硬変の犬では細胞療法に足る脂肪組織の採取ができない可能性が存在した。したがって本研究では、まず第 1 章で進行した慢性肝炎の犬において腹腔内脂肪が皮下脂肪と比較して安定的に存在することを明らかにし、腹腔内脂肪が細胞療法の組織由来として適していることを示した。また、腹腔鏡を使用することにより簡便に腹腔内脂肪の採取が可能であり、肝硬変症例における確定診断法である腹腔鏡下肝生検と同時に脂肪組織の採材を行うことで低侵襲かつ少量の脂肪組織から多量の犬 DFAT が作製可能であることを明らかにした。

DFAT を犬の肝硬変に臨床応用するためには自家組織由来の細胞を使用することが理想的であるが、治療が長期間に及ぶ場合や、自家の脂肪組織が採取不可能である場合には DFAT の他家移植が有効となり、その安全性の検討が必要である。したがって、第 2 章では DFAT の MHC 遺伝子の発現状況を解析し、複数の MHC 遺伝子が発現することを明らかにした。また、これまで獣医学領域において MHC 遺伝子の詳細なタイピングに基づいたドナー・レシピエント間のマッチングを行い、移植効率の差異を検討した報告はなかった。したがって、DFAT の他家移植に向けて、シーケンスに基づいた詳細な MHC 型のマッチングが移植効率に与える影響を皮膚移植により検証した。その結果、MHC

遺伝子をドナー・レシピエント間でマッチングすることにより、移植片の生着率は向上した。したがって、MHC 型のマッチングにより他家犬 DFAT を効率的かつ安全に投与できる可能性を明らかにした。

さらに第 3 章では DFAT の投与に必要な基礎的な条件を決定した。犬 DFAT は高い増殖能を有し、細胞径の小さい Passage 2 までの細胞をラクトリンゲル液に室温保存することで長時間にわたり高い生存率が維持されることを明らかにした。また、実際の肝硬変症例を想定した腹腔鏡下脂肪採取により自家 DFAT を作製し、末梢静脈および門脈経由に安全に投与できることを確認した。

以上の所見は、犬 DFAT を臨床例に対し低侵襲かつ安全に応用できることを示す知見であり、既存の治療に抵抗性のある犬の肝硬変に対する新規の治療に寄与するものであると考えられる。

謝辞

本研究を完遂するに至るまで、終始温かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました、日本大学生物資源科学部獣医学科獣医放射線学研究室の中山智宏教授、同魚病学/比較免疫学研究室の森友忠昭教授、同獣医消化器病学研究室の坂井学教授に謹んで御礼申し上げます。

また、犬脱分化脂肪細胞の作製および解析を行うにあたり、多岐にわたる実験の技術指導並びにご助言を賜りました日本大学生物資源科学部応用生物科学科動物生体機構学研究室の加野浩一郎教授、沖嘉尚助教、伊林志穂研究員に深謝いたします。

加えて、主要組織適合性複合体遺伝子の解析および皮膚移植を行うにあたり、技術指導並びにご助言を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科獣医病理学研究室の渋谷久教授、同魚病学/比較免疫学研究室の片倉文彦講師、岡山理科大学獣医学科獣医免疫学講座の宮前二郎助教に厚く御礼申し上げます。

さらには、多くの実験にご協力いただいた獣医消化器病学研究室の阪本裕美研究員ならびに獣医内科学研究室の学部生諸君に深く感謝致します。

最後に、大学院博士課程への進学を応援いただき、終始温かく見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

引用文献

Abb J, Grosse-Wilde H, Scholz S, Albert ED: Matching for dla-a, dla-b and dla-d antigens and skin allograft survival in unrelated beagle dogs. (1978) *European Surgical Research*. 10:142–145.

Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJM, Kol A, Walker NJ, Badgley MR, Fazel N, Murphy WJ, Vapniarsky N, Borjesson DL: Therapeutic efficacy of fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. (2016) *STEM CELLS Translational Medicine*. 5:75–86.

Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M: Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. (2009) *The FASEB Journal*. 23:3494–3505.

Bahamondes F, Flores E, Cattaneo G, Bruna F, Conget P: Omental adipose tissue is a more suitable source of canine mesenchymal stem cells. (2017) *BMC Veterinary Research*. 13:1–9.

Bearden RN, Huggins SS, Cummings KJ, Smith R, Gregory CA, Saunders WB: In-vitro characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: A donor-matched comparative study. (2017) *Stem Cell Research and Therapy*. 8:1–22.

Bertolo A, Schlaefel P, Malonzo-Marty C, Baur M, Pötzel T SF and SJ:

Comparative characterization of canine and human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. (2015) *International Journal of Stem cell Research & Therapy*. 2:1–6.

Bronzini I, Patruno M, Iacopetti I, Martinello T: Influence of temperature, time and different media on mesenchymal stromal cells shipped for clinical application. (2012) *Veterinary Journal*. 194:121–123.

Bush WJ, Davis JP, Maluccio MA, Kubal CA, Salisbury JB, Mangus RS: Computed tomography measures of nutrition in patients with end-stage liver disease provide a novel approach to characterize deficits. (2018) *Transplantation Proceedings*. 50:3501–3507.

Cabon Q, Febre M, Gomez N, Cachon T, Pillard P, Carozzo C, Saulnier N, Robert C, Livet V, Rakic R, Plantier N, Saas P, Maddens S, Viguier E: Long-term safety and efficacy of single or repeated intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stromal cells for managing pain and lameness in moderate to severe canine osteoarthritis without anti-inflammatory pharmacological support: pi. (2019) *Frontiers in Veterinary Science*. 6:1–14.

Cao Y, Ji C, Lu L: Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis. (2020) *Annals of Translational Medicine*. 8:562–562.

Cheng CH, Lee CF, Fryer M, Furtmüller GJ, Oh B, Powell JD, Brandacher G: Murine full-thickness skin transplantation. (2017) *Journal of Visualized Experiments*. 2017:3–7.

Chow L, Johnson V, Coy J, Regan D, Dow S: Mechanisms of immune

suppression utilized by canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. (2017) *Stem Cells and Development*. 26:374–389.

Coppin LCF, Smets F, Ambroise J, Sokal EEM, Stéphenne X: Infusion-related thrombogenesis by liver-derived mesenchymal stem cells controlled by anticoagulant drugs in 11 patients with liver-based metabolic disorders. (2020) *Stem Cell Research and Therapy*. 11:1–10.

DePompeo CM, Giassetti MI, Elnaggar MM, Oatley JM, Davis WC, Fransson BA: Isolation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells from falciform tissue obtained via laparoscopic morcellation: A pilot study. (2020) *Veterinary Surgery*. 49:O28–O37.

Edinur HA, Chambers GK, Dunn PPJ: Recent developments in transplantation and transfusion medicine. (2015) *Annals of Transplantation*. 20:424–429.

Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, Baan CC, Dahlke MH, Hoogduijn MJ: Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. (2012) *Frontiers in Immunology*. 3:1–8.

Fang J, Yan Y, Teng X, Wen X, Li N, Peng S, Liu W, Donadeu FX, Zhao S, Hua J: Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating NRF2 and inhibiting ER stress. (2018)a *Aging*. 10:2954–2972.

Fang X, Liu L, Dong J, Zhang J, Song H, Song Y, Huang Y, Cui X, Lin J, Chen C, Liu B, Chen Z, Pan J, Chen X: A study about immunomodulatory effect and

efficacy and prognosis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with chronic hepatitis B-induced decompensated liver cirrhosis. (2018) *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 33:774–780.

Favier RP, Poldervaart JH, van den Ingh TSGAM, Penning LC, Rothuizen J: A retrospective study of oral prednisolone treatment in canine chronic hepatitis. (2013) *Veterinary Quarterly*. 33:113–120.

Filioli Uranio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'Abbate A, Catacchio CR, Ventura M, Cremonesi F, Dell'Aquila ME: Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. (2011) *Molecular Reproduction and Development*. 78:361–373.

Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A: Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. (2015) *Journal of Hepatology*. 62:S157–S169.

Fuchimoto Y, Gleit ZL, Huang CA, Kitamura H, Schwarze ML, Menard MT, Mawulawde K, Madsen JC, Sachs DH: Skin-specific alloantigens in miniature swine. (2001) *Transplantation*. 72:122–126.

Fujita Y, Nishimura M, Komori NW, Wada T, Shirakawa C, Takenawa T, Sawamoto O, Doi M: A pair of cell preservation solutions for therapy with human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. (2020) *Regenerative Therapy*. 14:95–102.

Furlani D, Ugurlucan M, Ong LL, Bieback K, Pittermann E, Westien I, Wang

W, Yerebakan C, Li W, Gaebel R, Li R ke, Vollmar B, Steinhoff G, Ma N: Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. (2009) *Microvascular Research*. 77:370–376.

Gardin C, Ferroni L, Bellin G, Rubini G, Barosio S, Zavan B: Therapeutic potential of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of liver disease. (2018) *International Journal of Molecular Sciences*. 19:1–27.

Ge J, Guo L, Wang S, Zhang Y, Cai T, Zhao RCH, Wu Y: The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. (2014) *Stem Cell Reviews and Reports*. 10:295–303.

Gehrie EA, Cates JM, Nian H, Olson SJ, Young PP: Blood Group A antigen expression on cardiac endothelium is highly individualized: Possible implications for transplantation. (2013) *Cardiovascular Pathology*. 22:251–256.

Goggs R, Chan DL, Benigni L, Hirst C, Kellett-Gregory L, Fuentes VL: Comparison of computed tomography pulmonary angiography and point-of-care tests for pulmonary thromboembolism diagnosis in dogs. (2014) *Journal of Small Animal Practice*. 55:190–197.

Gugjoo MB, Amarpal A, Sharma GT: Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. (2019) *Journal of Cellular Physiology*. 234:16779–16811.

Hakim R, Covacu R, Zachariadis V, Frostell A, Sankavaram SR, Brundin L, Svensson M: Mesenchymal stem cells transplanted into spinal cord injury adopt immune cell-like characteristics. (2019) *Stem Cell Research and Therapy*. 10:1–

16.

Heineman E, Meijssen MAC, de Bruin RWF, Marquet RL, Molenaar JC: Electrophysiologic and histological monitoring of MHC-matched and mismatched canine intestinal allografts. (1991) *Journal of Pediatric Surgery*. 26:893–899.

Hopper K, Mehl ML, Kass PH, Kyles A, Gregory CR: Outcome after Renal Transplantation in 26 Dogs. (2012) *Veterinary Surgery*. 41:316–327.

Isakova IA, Lanclos C, Bruhn J, Kuroda MJ, Baker KC, Krishnappa V, Phinney DG: Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. (2014) *PLoS ONE*. 9:e87238.

Ishioka S, Hosokawa T, Ikeda T, Konuma N, Kaneda H, Ohashi K, Furuya T, Masuko T, Taniguchi H, Kano K, Koshinaga T, Matsumoto T: Therapeutic potential of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for inflammatory bowel disease. (2020) *Pediatric Surgery International*. 36:799–807.

Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S ichiro, Kano K, Kusumi Y, Masuko T, Mitsumata M, Saito S, Hirayama A, Mugishima H, Fukuda N: Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. (2009) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 47:565–575.

Jung JW, Kwon M, Choi JC, Shin JW, Park IW, Choi BW, Kim JY: Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. (2013) *Yonsei Medical Journal*. 54:1293–1296.

Kang MH, Park HM: Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. (2014) *Acta veterinaria Scandinavica*. 56:16.

Kemp SD, Zimmerman KL, Panciera DL, Monroe WE, Leib MS, Lanz OI: A Comparison of Liver Sampling Techniques in Dogs. (2015) *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 29:51–57.

Kim SJ, Park KC, Lee JU, Kim KJ, Kim DG: Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. (2011) *Journal of the Korean Surgical Society*. 81:176–186.

Kim WK, Kim WH, Kweon OK, Kang BJ: Intravenous administration of heat shock-treated mscs can improve neuroprotection and neuroregeneration in canine spinal cord injury model. (2020) *Animals*. 10:1–16.

Kim Y, Jo SH, Kim WH, Kweon OK: Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. (2015) *Stem Cell Research and Therapy*. 6:1–10.

Kisiel AH, McDuffee LA, Masaoud E, Bailey TR, Esparza Gonzalez BP, Nino-Fong R: Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. (2012) *American Journal of Veterinary Research*. 73:1305–1317.

Kobayashi T, Koie H, Kusumi A, Kitagawa M, Kanayama K, Otsuji K: Comparative investigation of body composition in male dogs using CT and body fat analysis software. (2014) *Journal of Veterinary Medical Science*. 76:439–446.

Kocken JM, Borel Rinkes IHM, Bijma AM, De Roos WK, Bouwman E, Terpstra OT, Sinaasappel M: Correction of an inborn error of metabolism by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model. (1996) *Transplantation*. 62:358–364.

Kono S, Kazama T, Kano K, Harada K, Uechi M, Matsumoto T: Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. (2014) *Veterinary Journal*. 199:88–96.

Kornblit B, Leisenring WM, Santos EB, Storb R, Sandmaier BM: Safety of treatment with DLA-identical or unrelated mesenchymal stromal cells in DLA-identical canine bone marrow transplantation. (2013) *Chimerism*. 4:95–101.

Kruitwagen HS, Oosterhoff LA, van Wolferen ME, Chen C, Nantasanti Assawarachan S, Schneeberger K, Kummeling A, van Straten G, Akkerdaas IC, Vinke CR, van Steenbeek FG, van Bruggen LWL, Wolfswinkel J, Grinwis GCM, Fuchs SA, Gehart H, Geijsen N, Vries RG, Clevers H et al.: Long-term survival of transplanted autologous canine liver organoids in a COMMD1-deficient dog model of metabolic liver disease. (2020) *Cells*. 9:1–17.

Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C: High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. (2007) *Blood*. 110:4576–4583.

Li T, Zhu J, Ma K, Liu N, Feng K, Li X, Wang S, Bie P: Autologous bone

marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes liver regeneration after portal vein embolization in cirrhotic rats. (2013) *Journal of Surgical Research*. 184:1161–1173.

Liang J, Zhang H, Zhao C, Wang D, Ma X, Zhao S, Wang S, Niu L, Sun L: Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases. (2017) *International Journal of Rheumatic Diseases*. 20:1219–1226.

Malchenko S, Xie J, de Fatima Bonaldo M, Vanin EF, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Xi G, Galat V, Goossens W, Seftor REB, Tomita T, Crispino J, Miller RJ, Bohn MC, Hendrix MJC, Soares MB: Onset of rosette formation during spontaneous neural differentiation of hESC and hiPSC colonies. (2014) *Gene*. 534:400–407.

Marcoccia R, Nesci S, Merlo B, Ballotta G, Algieri C, Pagliarani A, Iacono E: Biological characteristics and metabolic profile of canine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue and umbilical cord matrix. (2021) *PLoS ONE*. 16:e0247567.

Matsuda T, Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Aibe Y, Paredes BD, Quintanilha LF, Matsumoto T, Ishikawa T, Yamamoto N, Tani K, Terai S, Taura Y, Sakaida I: A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. (2017) *Hepatology Communications*. 1:691–703.

Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y,

Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H: Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. (2008) *Journal of Cellular Physiology*. 215:210–222.

Miyamae J, Suzuki S, Katakura F, Uno S, Tanaka M, Okano M, Matsumoto T, Kulski JK, Moritomo T, Shiina T: Identification of novel polymorphisms and two distinct haplotype structures in dog leukocyte antigen class I genes: DLA-88, DLA-12 and DLA-64. (2018) *Immunogenetics*. 70:237–255.

Miyamae J, Yagi H, Sato K, Okano M, Nishiya K, Katakura F, Sakai M, Nakayama T, Moritomo T, Shiina T: Evaluation of alloreactive T cells based on the degree of MHC incompatibility using flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay in dogs. (2019) *Immunogenetics*. 71:635–645.

Morizane A, Kikuchi T, Hayashi T, Mizuma H, Takara S, Doi H, Mawatari A, Glasser MF, Shiina T, Ishigaki H, Itoh Y, Okita K, Yamasaki E, Doi D, Onoe H, Ogasawara K, Yamanaka S, Takahashi J: MHC matching improves engraftment of iPSC-derived neurons in non-human primates. (2017) *Nature Communications*. 8:1–12.

Muraca M, Neri D, Parenti A, Feltracco P, Granato A, Vilei MT, Ferrareso C, Ballarin R, Zanusso GE, Giron G, Rozga J, Gerunda G: Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: A hemodynamic and histopathological study. (2002) *Transplantation*. 73:890–896.

Murata D, Yamasaki A, Matsuzaki S, Sunaga T, Fujiki M, Tokunaga S, Misumi K: Characteristics and multipotency of equine dedifferentiated fat cells. (2016)

Journal of Equine Science. 27:57–65.

Nagao I, Ohno K, Nagahara T, Yokoyama N, Nakagawa T, Fujiwara R, Yamamoto K, Goto-Koshino Y, Tomiyasu H, Tsujimoto H: Evaluation of visceral fat mass in dogs by computed tomography. (2019) *Journal of Veterinary Medical Science.* 81:1552–1557.

Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sato M, Shibukawa Y, Masuhiro Y, Kano K, Matsumoto T, Sugiya H: All-trans retinoic acid induces reprogramming of canine dedifferentiated cells into neuron-like cells. (2020) *PLoS ONE.* 15:1–23.

Nakayama E, Matsumoto T, Kazama T, Kano K, Tokuhashi Y: Transplantation of dedifferentiation fat cells promotes intervertebral disc regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model. (2017) *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 493:1004–1009.

Nam A, Han SM, Go DM, Kim DY, Seo KW, Youn HY: Long-Term Management with Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Conventional Treatment in a Dog with Hepatocutaneous Syndrome. (2017) *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 31:1514–1519.

Nishimura T, Takami T, Sasaki R, Aibe Y, Matsuda T, Fujisawa K, Matsumoto T, Yamamoto N, Tani K, Taura Y, Sakaida I: Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. (2019) *PLoS ONE.* 14:1–16.

Olsen A, Johnson V, Webb T, Santangelo KS, Dow S, Duerr FM: Evaluation of

Intravenously Delivered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Pilot Study. (2019) *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 32:173–181.

Or M, Ishigaki K, de Rooster H, Kutara K, Asano K: Determination of Porto-Azygos Shunt Anatomy in Dogs by Computed Tomography Angiography. (2016) *Veterinary Surgery*. 45:1005–1012.

Peng X, Song T, Hu X, Zhou Y, Wei H, Peng J, Jiang S: Phenotypic and functional properties of porcine dedifferentiated fat cells during the long-term culture in vitro. (2015) *BioMed Research International*. 2015:1–10.

Poloni A, Maurizi G, Leoni P, Serrani F, Mancini S, Frontini A, Zingaretti MC, Siquini W, Sarzani R, Cinti S: Human dedifferentiated adipocytes show similar properties to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. (2012) *Stem Cells*. 30:965–974.

Poloni A, Maurizi G, Ciarlantini M, Medici M, Mattiucci D, Mancini S, Maurizi A, Falconi M, Olivieri A, Leoni P: Interaction between human mature adipocytes and lymphocytes induces T-cell proliferation. (2015) *Cytotherapy*. 17:1292–1301.

Popli R, Sahaf B, Nakasone H, Lee JYY, Miklos DB: Clinical impact of H-Y alloimmunity. (2014) *Immunologic Research*. 58:249–258.

Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, Piryaee A, Azhdari Z, Baharvand H: Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. (2010) *Cell Biology*

International. 34:601–605.

Rauen U, Kerkweg U, de Groot H: Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: A comparative study in physiological media and organ preservation solutions. (2007) *Cryobiology*. 54:77–86.

Reece J, Pavlick M, Penninck DG, Webster CRL: Hemorrhage and complications associated with percutaneous ultrasound guided liver biopsy in dogs. (2020) *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 34:2398–2404.

Rudolph EN, Dunn TB, Mauer D, Noreen H, Sutherland DER, Kandaswamy R, Finger EB: HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ matching in pancreas transplantation: Effect on graft rejection and survival. (2016) *American Journal of Transplantation*. 16:2401–2412.

Sakamoto Y, Sakai M, Watari T: Three minimally invasive methods of measuring of portal vein pressure in healthy dogs. (2012) *Journal of Veterinary Medical Science*. 74:1299–1302.

Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, Fukuda N, Obinata D, Yamaguchi K, Yoshida T, Takahashi S, Mugishima H: Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. (2009) *Journal of Urology*. 182:355–365.

Sato K, Sakamoto Y, Sakai M, Ishikawa C, Nakazawa M, Cheng CJ, Watari T, Nakayama T: Diagnostic utility of computed tomographic angiography in dogs with portal vein thrombosis. (2020) *Journal of Veterinary Medical Science*. 82:1421–1427.

Sato K, Miyamae J, Sakai M, Okano M, Katakura F, Shibuya H, Nakayama T, Moritomo T: The utility of dla typing for transplantation medicine in canine models. (2020)^b *Journal of Veterinary Medical Science*. 82:1138–1145.

Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC, Borjesson DL, Zhu M: Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. (2014) *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 161:21–31.

Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA: Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. (1997) *Blood*. 89:776–779.

Shimizu T, Tanabe K, Tokumoto T, Shimmura H, Ishikawa N, Ishida H, Toma H, Kawaguchi H, Tokiwa M, Yamaguchi Y: Histological features of renal allograft biopsies in ABO minor-mismatched kidney transplantation. (2003) *Clinical Transplantation*. 17:9–13.

Sohn HS, Heo JS, Kim HS, Choi Y, Kim HO: Duration of in vitro storage affects the key stem cell features of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for clinical transplantation. (2013) *Cytotherapy*. 15:460–466.

Song J, Drobatz KJ, Silverstein DC: Retrospective evaluation of shortened prothrombin time or activated partial thromboplastin time for the diagnosis of hypercoagulability in dogs: 25 cases (2006-2011). (2016) *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 26:398–405.

Spriet M, Hunt GB, Walker NJ, Borjesson DL: Scintigraphic tracking of

mesenchymal stem cells after portal, systemic intravenous and splenic administration in healthy beagle dogs. (2015) *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 56:327–334.

Strombeck DR, Miller LM, Harrold D: Effects of corticosteroid treatment on survival time in dogs with chronic hepatitis: 151 cases (1977-1985). (1988) *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 193:1109–1113.

Suk KT, Yoon JH, Kim MY, Kim CW, Kim JK, Park H, Hwang SG, Kim DJ, Lee BS, Lee SH, Kim HS, Jang JY, Lee CH, Kim BS, Jang YO, Cho MY, Jung ES, Kim YM, Bae SH et al.: Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. (2016) *Hepatology*. 64:2185–2197.

Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, Mitsuta H, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T: Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: Immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. (2005) *Transplantation*. 79:1262–1267.

Tao YC, Chen EQ: Clinical application of stem cell in patients with end-stage liver disease: progress and challenges. (2020) *Annals of Translational Medicine*. 8:564.

Tatsumi K, Ohashi K, Matsubara Y, Kohori A, Ohno T, Kakidachi H, Horii A, Kanegae K, Utoh R, Iwata T, Okano T: Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. (2013)

Biochemical and Biophysical Research Communications. 431:203–209.

Teshima T, Matsumoto H, Michishita M, Matsuoka A, Shiba M, Nagashima T, Koyama H: Allogenic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate acute hepatic injury in dogs. (2017) *Stem Cells International*. 2017:3892514.

Truong NC, Bui KHT, Van Pham P: Characterization of Senescence of Human Adipose-Derived Stem Cells After Long-Term Expansion. (2019) *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1084:109–128.

Turner RBS, Tyrrell D, Hepworth G, Dunshea FR, Mansfield CS: Compartmental fat distribution in the abdomen of dogs relative to overall body fat composition. (2020) *BMC Veterinary Research*. 16:1–11.

Ullal T, Ambrosini Y, Rao S, Webster CRL, Twedt D: Retrospective evaluation of cyclosporine in the treatment of presumed idiopathic chronic hepatitis in dogs. (2019) *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 33:2046–2056.

van den Ingh TSGAM, Van Winkle T, Cullen JM, Charles JA, Desmet VJ: Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver: 2. Hepatocellular death, hepatitis and cirrhosis. (2006) *WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases*. 1st ed:85–101

Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G: Stem Cells in Veterinary Medicine—Current State and Treatment Options. (2020) *Frontiers in Veterinary Science*. 7:1–20.

Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD: Intra-

coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. (2004) *Lancet*. 363:783–784.

Wagner JL, Burnett RC, Storb R: Organization of the canine major histocompatibility complex: Current perspectives. (1999) *Journal of Heredity*. 90:35–38.

Wagner JL, Storb R, Storer B, Mignot E: DLA-DQB1 alleles and bone marrow transplantation experiments in narcoleptic dogs. (2000) *Tissue Antigens*. 56:223–231.

Wang J, Bian C, Liao L, Zhu Y, Li J, Zeng L, Zhao RC: Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms. (2009) *Hepatology Research*. 39:1219–1228.

Weber M, Lange C, Günther W, Franz M, Kremmer E, Kolb HJ: Minor histocompatibility antigens on canine hemopoietic progenitor cells. (2003) *The Journal of Immunology*. 170:5861–5868.

Webster CRL, Center SA, Cullen JM, Penninck DG, Richter KP, Twedt DC, Watson PJ: ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. (2019) *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 33:1173–1200.

Weil AB: Anesthesia for patients with renal/hepatic disease. (2010) *Topics in Companion Animal Medicine*. 25:87–91.

Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkera HA: The risk of transplant failure with hla mismatch in first adult kidney allografts from

deceased donors. (2016) *Transplantation*. 100:1094–1102.

Wu JG, Wang Q, Fu X, Wu XW, Gu CM, Bi JH, Xie FN, Kang N, Liu X, Yan L, Cao YL, Xiao R: Influence of immunogenicity of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells on bone tissue engineering. (2016) *Cell Transplantation*. 25:229–242.

Yan Y, Fang J, Wen X, Teng X, Li B, Zhou Z, Peng S, Arisha AH, Liu W, Hua J: Therapeutic applications of adipose-derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines. (2019) *Research in Veterinary Science*. 126:233–239.

Yang X, Meng Y, Han Z, Ye F, Wei L, Zong C: Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: full of chances and challenges. (2020) *Cell and Bioscience*. 10:1–18.

Yasuda K, Kotaka M, Toyohara T, Sueta SI, Katakai Y, Ageyama N, Uemoto S, Osafune K: A nonhuman primate model of liver fibrosis towards cell therapy for liver cirrhosis. (2020) *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 526:661–669.

Zachary AA, Leffell MS: HLA mismatching strategies for solid organ transplantation - a balancing act. (2016) *Frontiers in Immunology*. 7:1–14.

Zhang S, Yang Y, Fan L, Zhang F, Li L: The clinical application of mesenchymal stem cells in liver disease: the current situation and potential future. (2020) *Annals of Translational Medicine*. 8:565–565.