原 著

マウス急性移植片対宿主病モデルに対する
脱分化脂肪細胞移植の治療効果村井 健美¹⁾ 松本 太郎²⁾ 石毛 美夏¹⁾
風間 智彦²⁾ 加野浩一郎³⁾ 麦島 秀雄⁴⁾¹⁾ 日本大学医学部小児科学系小児科学分野²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野³⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科⁴⁾ 川越予防医療センター・クリニックEffect of Dedifferentiated Fat Cell Transplantation
in a Mouse Model of Acute Graft-Versus-Host DiseaseTakemi MURAI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾, Mika ISHIGE¹⁾,
Tomohiko KAZAMA²⁾, Kano KOICHIRO³⁾ and Hideo MUGISHIMA⁴⁾¹⁾ Department of Pediatrics and Child Health, Nihon University School of Medicine²⁾ Department of Functional Morphology, Division of Cell Regeneration and Transplantation, Nihon University School of Medicine³⁾ Laboratory of Cell and Tissue Biology, College of Bioresource Science, Nihon University⁴⁾ Kawagoe preventive medical center/clinic

Graft-versus-host disease (GVHD) is known to be one of the lethal complications of hematopoietic cell transplantation (HCT). Recently, cell therapy using mesenchymal stem cells (MSC) has been applied clinically for steroid-resistant acute GVHD. Since it has been confirmed that dedifferentiated fat cells (DFAT) possess immunomodulatory effects that are similar to MSC, these cells have the potential to be applied to the treatment of GVHD. In this study, we evaluated the effect of intravenous administration of DFAT cells in a mouse model of acute GVHD. We found that the administration of DFAT cells tended to improve survival, suppressed weight loss and improved the clinical score of the GVHD mice. These findings suggest that DFAT cells could become a new cell source for the treatment of acute GVHD.

Key words: dedifferentiated fat cell, graft versus host disease, cell therapy, mesenchymal stem cell
脱脂肪細胞, 移植片対宿主病, 細胞治療, 間葉系幹細胞

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2017; 76 (4-5): 187-194)

要旨 移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) は造血幹細胞移植 (hematopoietic cell transplantation: HCT) の致死合併症の一つとして知られている。近年ステロイド抵抗性急性 GVHD に対し間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) を用いた細胞治療の臨床応用が始まっている。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) には MSC と同様の免疫調節作用があることが確認されており、DFAT を GVHD の治療に応用できる可能性がある。本検討ではマウス急性 GVHD モデルを作製し、尾静脈から DFAT を投与し治療効果を検討した。DFAT を投与すると生存率が改善傾向を示し、体重減少が抑制され、臨床スコアが改善した。本検討により、DFAT が急性 GVHD の細胞治療のソースとなりうることを示した。

はじめに

造血幹細胞移植 (hematopoietic cell transplantation: HCT) は大量化学療法や放射線療法を組み合わせた強力な移植前治療によってレシピエントの造血・免疫系を破壊した後に造血幹細胞を輸注することで新たな造血・免疫系を再構築する治療法である。HCT は極めて有効な治療法であるが、重篤な副作用が存在するため、治療関連死亡のリスクが高いことが依然として大きな問題である。HCT 後の急性移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) はその重篤な副作用の代表である。GVHD の重症度は grade I; mild, grade II; moderate, grade III; severe, grade IV; very severe の4段階に分類される。grade III で5年生存率が25%, grade IV だと5%と極めて予後不良

受付: 2016年9月30日, 受理: 2017年1月10日

本論文の要旨は第11回日本再生医療学会総会発表(平成23年6月14日)にて発表された。

である¹⁾。また、grade II以上の急性GVHDの発症率は、血縁者間骨髄移植で25%、血縁者間末梢血幹細胞移植で35%、非血縁者間骨髄移植で42%、非血縁者間臍帯血移植で33%である²⁾。非血縁者間骨髄移植は年間1,000例ほど行われ、増加傾向にあり、これに伴い急性GVHDの発症例も増加すると予測される。

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は生体内に微量に存在する多分化能と免疫抑制能を有する細胞であり、ステロイド抵抗性の急性GVHDに対するMSCを用いた細胞治療の臨床応用が始まっている^{3,4)}。

Matsumotoらは、脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) が高い多分化能を獲得することを明らかにした⁵⁾。DFATとは哺乳類の成熟脂肪細胞を天井培養により体外培養することで得られる線維芽細胞様の形態をした細胞群である。DFATではLPL, Leptin, GLUT4などのいわゆる成熟脂肪細胞マーカーの発現が完全に消失している。一方、成熟脂肪細胞には通常発現していないRunx2, Sox9, 平滑筋 α アクチンといった、骨、軟骨、平滑筋の初期分化マーカーの発現が認められることから、DFATはいわゆる間葉系前駆細胞の形質をもった細胞群であると考えられている。DFATの細胞表面抗原は、培養骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cell: BM-MSC) や脂肪組織中に存在するMSC (adipose-derived stem cell: ASC) にほぼ一致した発現プロファイルを示す。また、DFATはMSCと同様の免疫調節作用を示すことが確認されており、GVHDへの抑制作用が期待できる。臨床応用を考えた場合、DFATは微量な脂肪組織から高純度、大量に調製可能で、全身状態が不良な患者や高齢者からも調製できるため、新規細胞治療ソースとして期待できる。一方DFATの移植によるGVHDへの効果は明らかにされていない。

本研究では、マウスに対し放射線照射による骨髄破壊的処置を行った後、骨髄細胞および脾臓から採取したCD3⁺細胞を移植し、マウス急性GVHDモデルの作製を試み、生存率、体重の推移と臨床スコアにより、DFAT移植の効果を検討した。

I. 研究材料および方法

1. 実験動物

B6D2F1 (MHC: H-2[b/d], 雌性, 7~8週齢) およびC57BL/6J (MHC: H-2[b], 雌性, 7~8週齢) はオリエンタル酵母工業から購入した。マウスは無菌室で飼育し、1週間に1回ゲージ交換、餌の補充、給水瓶の交換を行った。移植後28日目までは感染予防目的でネオマイシン (GIBCO, 1,484 mg/l) を添加した滅菌水を飲用水に使用した。動物の飼育、実験は日本大医学部動物実験指針に準拠して施行した (承認番号: 第AP10M079-2号)。

2. DFATの調整

YagiらはddYマウス由来の脂肪組織をコラゲナーゼ処理することによって得られた成熟脂肪細胞を用いて天井培養を行いDFAT-D1と呼ばれるDFATのcell lineを確立した⁶⁾。DFAT-D1は高い増殖能を有し安定して細胞を得ることができ、本実験ではこの細胞を使用した。

凍結保存されているDFATを解凍後、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, JRH Bioscience) 含有Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) を用い、培養を行い4~5日毎に継代した。調整したDFATは、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) で洗浄後、0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen) で培養皿から剥離し、Z1 coulter particle counter (Beckman coulter) で細胞数をカウント後、実験に使用した。

3. 放射線照射

X線照射装置MBR-1520R-3 (Hitachi) を用いて、骨髄移植の24時間前に管電圧150 kV、管電流20 mAで11 Gyの放射線量でB6D2F1マウスに全身照射した。

4. 骨髄細胞の採取

C57BL/6Jマウスより大腿骨、脛骨を取り、付着している余分な組織を除去した後、PBSで何回か洗浄した。1 mlのethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 添加PBSを22 G注射針 (Nipro) のついた2 mlシリンジで取り、骨端から骨髓腔に穿刺し、骨髓細胞をシャーレに洗い出した。その後、懸濁液を40 μ mのセルストレーナー (BD Falcon) でろ過し、EDTA添加PBSで再懸濁し、細胞数を調整した。

5. CD3⁺細胞の採取

C57BL/6Jのドナーマウスより脾臓を摘出した後に、gentle MACS dissociator (Mylteny Biotec) で破碎しMouse CD3⁺ T Cell Enrichment Column (R&D systems) を用いてCD3⁺細胞を分離した。分離したCD3⁺細胞にallophycocyanin (APC) 標識抗マウスCD3抗体 (BD Biosciences) または陰性コントロールとしてAPC標識ストレプトアビジン (BD Biosciences) を反応させた。死細胞を同定するために7-aminoactinomycin D (7AAD, BD Biosciences) を反応させた。FACSCaliburTM フローサイトメーター (Becton Dickinson) を用いてCD3⁺細胞の陽性率を計測した。

6. フローサイトメトリー

骨髄移植後21日目に、B6D2F1レシピエントマウス、C57BL/6Jドナーマウス、11 Gy放射線照射後にC57BL/6Jマウス由来骨髄細胞を移植したB6D2F1レシピエントマウス、それぞれから骨髄細胞を採取した。採取した細胞を0.5% BSA添加PBSを用いて懸濁し、5 $\times$ 10⁵/50 μ lに調整した。非特異的結合を阻害するため、FcR

Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) を 5 μ l 加え、室温で 10 分間静置した。PE 標識抗マウス H-2K[d] 抗体 (BD Pharmingen) 1 μ l または PE 標識抗マウス IgG α 抗体 (BD Pharmingen) 1 μ l を加え、遮光して氷上で 30 分間冷置し、染色を行った。細胞に 0.5% BSA 添加 PBS 1 ml を加えて洗浄後、0.5% BSA 添加 PBS 400 μ l で懸濁し、5 ml の FACS チューブ (BD Falcon) に移した。死細胞を検出するために各チューブに 7AAD を 4 μ l ずつ添加した。FACSCalibur™ フローサイトメーターを用いて細胞表面抗原測定を行い、CellQuest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いて測定結果の解析を行った。陰性コントロールサンプルとの蛍光シグナルと比較を行い、骨髓のキメリズムを解析した。さらに、移植後の骨髓細胞の血液細胞への分化をみるため、FITC 標識した抗マウス Gr-1 抗体 (BD Pharmingen)、抗マウス B220 抗体 (BD Pharmingen)、抗マウス CD4 抗体 (BD Pharmingen)、抗マウス CD8 抗体 (BD Pharmingen) または PE 標識抗マウス H-2K[d] 抗体をそれぞれ 1 μ l 反応させ、同様の方法でフローサイトメトリ解析を行った。

7. マウス急性 GVHD モデルに対する DFAT 移植実験

レシピエントとして B6D2F1 マウスに 11 Gy の全身放射線照射による骨髓破壊的処置を行った。24 時間後に C57BL/6J ドナーマウスの骨髓から骨髓細胞を採取し、同じドナーマウスの脾臓から CD3⁺ 細胞を単離した。尾静脈から骨髓細胞と CD3⁺ 細胞を同時にレシピエントマウスに投与し、急性 GVHD を誘導した。

計 30 頭のマウスを、Control 群 ($n = 10$) として骨髓細胞 (1×10^7 /body) のみを投与した群、GVHD 群 ($n = 10$) として骨髓細胞 (1×10^7 /body) と CD3⁺ 細胞 (3×10^6 /body) を同時に投与した群、GVHD+DFAT 群 ($n = 10$) の 3 群に分けた。GVHD+DFAT 群では、骨髓細胞 (1×10^7 /body) と CD3⁺ 細胞 (3×10^6 /body) の投与に加え、DFAT (5×10^5 /body) を移植当日、7 日後、14 日後にそれぞれを尾静脈より投与した。急性 GVHD モデルに対する細胞投与法は、既報⁷⁾ の方法に準じて行った。

8. GVHD の評価法

移植日より毎週 2 回、急性 GVHD の評価を行った。評価項目は生存率 (Kaplan-Meier 曲線の作成)、体重の推移、臨床スコアを用いた。臨床スコアは Fukui らの方法⁸⁾ に従い、体重、姿勢、活動性、毛並み、皮膚所見をおのおの 0-2 点とし、その合計を 0-10 点でスコア化した。0 点が最軽症の GVHD となり、10 点が最重症となる (Table 1, 式 1)。臨床スコアの評価は、研究実施者と評価者を分け、各群の飼育ゲージにある群名を記した札を評価者には見えないようにすることにより盲検化した。

Table 1 GVHD clinical score

Grade	体重減少率	姿勢	活動性	毛並み	皮膚所見
0	< 10%	正常	正常	正常	正常
1	10%–25%	軽度の亀背	軽度低下	軽度の毛羽立ち	足、尾の魚鱗様変化
2	$\geq 25\%$	重度の亀背	刺激しないと動かない	重度の毛羽立ち	明らかな脱毛

式 1: 体重減少率

$$= \langle (\text{元の体重} - X \text{ 週の体重}) / \text{元の体重} \rangle \times 100$$

9. 統計処理

それぞれのデータは mean $\pm$ SD で示した。3 群間の比較は一元配置分散分析で有意差検定を行った後、post hoc 解析として Tukey-Kramer test を用いて各群間の比較を行った。生存分析では Log-Rank test を行った。統計処理は Mini StatMate (アトムス) と Prism5 (GraphPad Software) を用いた。

II. 結 果

1. 骨髓移植後のキメリズム解析

11 Gy の放射線照射をしたマウスの骨髓移植後 21 日目のフローサイトメトリの解析において、骨髓細胞の大部分はレシピエント MHC タイプである H-2K[d] が陰性であり、ドナータイプに置換されていることが示唆された (Fig. 1A)。また、H-2K[d] 陰性分画には、顆粒球系のマーカー Gr-1、B 細胞球系のマーカー B220、T 細胞系のマーカー CD4、CD8 が陽性を示す細胞がそれぞれ認められた (Fig. 1B)。以上の結果より、移植した骨髓細胞が各種血液細胞に分化、成熟していることが確認された。

2. マウス急性 GVHD モデルへの DFAT 移植の効果の検討

各群の生存曲線を Fig. 2 に示す。Control 群は、移植後 84 日の観察期間中、死亡したのは 2 頭のみであった。GVHD 群は、移植後 20 日目より死亡例が認められ、移植後 32 日後には 90% が死亡し、移植後 54 日目に全例死亡するに至った。一方、GVHD+DFAT 群は移植後 24 日目から死亡例がみられたものの、そのカーブは緩やかであり、移植後 84 日目まで生存例が認められた。統計解析の結果、Control 群に比べ GVHD 群、GVHD+DFAT 群では有意に生存率の低下が認められた ($p < 0.01$)。一方、GVHD 群と GVHD+DFAT 群の間には統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.093$)。

各群の個体の体重の推移では Control 群では、移植後

Fig. 1 Chimerism analysis of bone marrow cells after bone marrow transplantation in mice

Bone marrow cells isolated from C57BL/6J mice were intravenously injected into irradiated B6D2F1 mice. At 21 days after transplantation, bone marrow cells were collected and subjected to flow cytometry. (A) Expression of recipient type MHC (H-2k[d]) was evaluated in a recipient B6D2F1 mouse, a donor C57BL/6J mouse, and a C57BL/6J bone marrow transplanted B6D2F1 mouse. (B) Expression of blood cell markers Gr-1, B220, CD4, and CD8 was evaluated in the bone marrow transplanted mouse.

Fig. 2 The effect of DFAT cell transplantation on the survival rate in the mice acute GVHD model

Mice were divided into three groups (each group $n = 10$): (i) Control group, in which bone marrow cells were administrated, (ii) GVHD group, in which bone marrow cells and CD3⁺ cells were administrated, (iii) GVHD + DFAT group, in which DFAT cells were additionally administrated at 0, 7 and 14 days after GVHD induction. **: $p < 0.01$ vs Control (Log-rank test).

3 日目に 15% 程度の体重減少を認めるがその後は各個体とも増加に転じ、移植後 10 日目にはほぼ全ての個体が移植前の体重に復帰し、それ以降は体重の減少は認めなかった (Fig. 3A). GVHD 群では移植後 7 日目まで、体重が減少し、その後、一旦は体重が軽度増加するが、その後は移植後 28 日目まで連続的に体重減少が認められた (Fig. 3B). 一方 GVHD + DFAT 群の体重の推移には個体差があり、移植後 7 日目頃まで体重減少を認めた後、回復する個体が多く認められた (Fig. 3C).

各群の体重推移を比較したグラフを Fig. 4 に示す。Control 群は移植後 3 日目までは体重が一旦は減少するものの、その後の体重は増加し、移植後 14 日目までには移植前の体重にまで回復した。GVHD + DFAT 群は全期間を通じ GVHD 群よりも体重減少の減り方が少なく、移植後 14, 24 日目には GVHD + DFAT 群は GVHD 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$).

移植後 28 日目における各群の代表的な肉眼的所見を

Fig. 3 The effect of DFAT cell transplantation on body weight in the mouse GVHD model. Changes in body weight of each mouse in the Control group (A), the GVHD group (B), and the GVHD+DFAT group (C) are shown.

Fig. 4 The effect of DFAT cell transplantation on body weight in the mouse GVHD model

Changes in body weight of mice in the Control group, the GVHD group, and the GVHD + DFAT group are shown. Data represent mean $\pm$ SD. *: $p < 0.05$ vs GVHD group, **: $p < 0.01$ vs GVHD and GVHD + DFAT group (Tukey-Kramer test).

Fig. 5 に示す。Control 群では活動性が高く、脱毛はほとんど認めず、毛羽立ちも認めなかった。一方、GVHD 群ではほぼ全例で下痢を認め、活動性が低く、亀背、毛羽立ち、脱毛が認められた。GVHD+DFAT 群では、多くの個体で毛羽たちや脱毛を認めるものの、GVHD 群と比べると軽度であり、活動性も良好であり、下痢を認

める個体もほとんど存在しなかった。

各群の GVHD 臨床スコアの比較を Fig. 6 に示す。移植後 21, 24, 28 日目において、GVHD 群および GVHD + DFAT 群は、Control 群に比べ、臨床スコアが有意に高かった ($p < 0.01$)。これらの時点において、GVHD + DFAT 群は GVHD 群に比べ臨床スコアが低い傾向にあり、移植後 28 日目のスコアは有意に低値 ($p < 0.05$) を認めた。

Ⅲ. 考 察

今回の結果から、マウス急性 GVHD モデルに DFAT を全身投与すると GVHD が抑制できる可能性が示された。すでに急性 GVHD に対する臨床研究が行われている MSC の免疫制御メカニズムとして、Transforming growth factor- β (TGF- β), Hepatocyte growth factor (HGF), Nitric oxide (NO), HLA-G, Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), プロスタグランジン E2 といった免疫制御に関わる液性因子の重要性が報告されている^{9, 10, 11}。また、制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) に急性 GVHD 抑制作用があることが報告されている¹² が、MSC は in vitro で Treg を誘導する作用があることが確認されている¹³。DFAT は MSC と非常に類似した液性因子の分泌プロファイルを示すことが報告されている¹⁴。このため DFAT も MSC と同様に種々の免疫制御に係わる液性因子の分泌や Treg の誘導を介して急性 GVHD の抑制作用を示した

Fig. 5 The effect of DFAT cell transplantation on clinical symptoms in the mouse GVHD model

Representative macroscopic pictures of mice at 28 days after treatment in the Control group, the GVHD group, and the GVHD + DFAT group are shown.

Fig. 6 The effect of DFAT cell transplantation on the clinical score in the mouse GVHD model

The GVHD clinical score of mice at 21, 24, and 28 days after treatment in the Control group, the GVHD group, and the GVHD + DFAT group are shown. Bars represent mean $\pm$ SD. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ (Tukey -Kramer test).

ことが予想される。今後これらのメカニズムを明確にする必要がある。

GVHD 群と GVHD+DFAT 群の生存曲線を比較すると、移植後早期では GVHD+DFAT 群の方が GVHD 群よりも生存率は高く、移植後 84 日目にも GVHD+DFAT 群は生存例を認めた。しかし、40 日前後より GVHD+DFAT 群と GVHD 群の生存率の差が小さくなった。今回の検討では DFAT の投与は骨髄移植後 0, 7, 14 日の 3 回であったため、DFAT 投与の約 3 週間後には DFAT

が失活または拒絶された可能性がある。骨髄 MSC の免疫抑制効果も短期的であることが指摘されており、実際に骨髄 MSC を用いた臨床研究でも週 2 回、4 週間投与するプロトコルが採用されている。静脈内投与された DFAT がどの程度の期間生体内に存在するのかは明らかにはなっていない。アロ骨髄 MSC における検討では移植後、生体内に 4-8 週間存在することが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。本研究では増殖活性が高いという理由から ddY マウス由来の DFAT 細胞株を移植に用いた。ddY マウス

はクローズドコロニーとして維持されている非近交系のマウスであるため、MHC は多系性を示す。従って、今回の実験は MHC 不一致により、DFAT が早期に生体内から排除され、免疫抑制効果が減ってしまった可能性がある。

今回の検討では移植した DFAT の局在や DFAT の標的臓器への移行は明らかではない。今後、蛍光ラベルした DFAT を用いて移植後の局在や動態を検討する必要がある。骨髄 MSC の静脈内投与実験では、移植された大部分の MSC が肺に一旦トラップされ、マクロファージ等の免疫担当細胞との相互作用により、Tumor necrosis factor-stimulated gene 6 (TSG-6) に代表されるサイトカインを分泌し、エンドクライン効果により遠隔の標的組織に抗炎症作用を示すことが報告されている¹⁸⁾。DFAT も同様の機序で標的組織に移行しなくても遠隔的に効果を示す可能性がある。

DFAT は均質な MSC 様細胞を低侵襲性に大量調製できることから、急性 GVHD に対する新たな治療用細胞として期待できる。一方、今後急性 GVHD に対する治療効果について DFAT と MSC とを直接比較する実験が必要である。本研究で用いた急性 GVHD モデルと細胞移植実験プロトコルは Yanez ら⁷⁾ が報告した方法に準拠している。この報告では、マウス骨髄 MSC を 7 日間隔で 3 回投与しているが、急性 GVHD による死亡率を抑制できなかった。この結果と本研究結果を直接比較することはできないが、DFAT の急性 GVHD 抑制効果は骨髄 MSC に比べて非劣勢である可能性が示唆される。近年マウス MSC は T 細胞の増殖抑制に重要な機能的IDO 酵素の発現を欠き、ヒト MSC に比べて免疫抑制能が低いことが明らかにされている^{19, 20)}。したがってマウス細胞を用いた実験では、ヒト細胞の治療効果を正確に反映しない可能性がある。最終的には同一ドナーに由来するヒト MSC と DFAT との直接比較による検証実験が必要であると考えられる。

IV. 結 論

本研究ではマウス急性 GVHD モデルに尾静脈から DFAT を投与すると生存率が改善傾向を示し臨床スコアが改善した。また、DFAT 投与によりマウスの体重減少は抑制された。本検討を通して、急性 GVHD に対する DFAT を用いた新規細胞治療の可能性が示唆された。今後、さらなる研究を続け、臨床へと還元していくことが望まれる。

V. 謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究全般を支えてご指導、ご助言くださいました日本大学医学部小児科学系小児科分野主任教授高橋昌里先生に深謝いたします。また研究に際し、適切なご指導を頂いた日本大学医学部機能形態学

系細胞再生・移植医学分野教室スタッフの方々に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005; **106**: 1495–1500.
- 2) The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). Annual report of nationwide survey 2008. JSHCT Data Center, Nagoya.
- 3) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; **30**: 42–48.
- 4) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; **363**: 1439–1441.
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210–222.
- 6) Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, et al. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 967–974.
- 7) Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; **24**: 2582–2591.
- 8) Fukui J, Inaba M, Ueda Y. Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 1595–1601.
- 9) Ark MJ, Park HS, Cho ML, et al. Transforming growth factor beta-transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2011; **63**: 1668–1680.
- 10) Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 141–150.
- 11) Meisei R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; **103**: 4619–4621.
- 12) Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; **99**: 3493–3499.
- 13) DI Nichola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-Lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; **99**: 3838–3840.
- 14) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and avarice-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 2013; **19**: 1792–1802.
- 15) Cho SW, Sun HJ, Yang JY, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice. *Mol Ther* 2009; **17**: 1979–1987.
- 16) Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA, et al. In vivo dis-

- tribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells* 2007; **25**: 220–227.
- 17) Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009; **27**: 1887–1898.
- 18) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 54–63.
- 19) Sudres M, Norol F, Trenado A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2006; **176**: 7761–7767.
- 20) Meisel R, Brockers S, Heseler K, et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* 2011; **25**: 648–654.