

MIG and I309 accelerates proliferation of human
bone marrow-derived mesenchymal stem cells
(MIG と I309 はヒト骨髄由来間葉系幹細胞
の増殖を促進する)

氏名 相部 祐希

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系専攻
消化器内科学分野

令和2年3月

目次

1. 要旨・・・・・・・・・・・・・・・・1
2. 研究の背景・目的・・・・・・・・2
3. 方法・・・・・・・・・・・・・・3~8
4. 結果・・・・・・・・・・・・・・9~16
5. 考察・・・・・・・・・・・・・・17~18
6. 結語・・・・・・・・・・・・・・19
7. 謝辞・・・・・・・・・・・・・・19
8. 参考文献・・・・・・・・・・・・20~24

【要旨】

背景: 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSCs) は再生医療の細胞源として注目されている体性幹細胞であり、様々な疾患に対して有効性が報告されている。一方で、さらに治療効果を高めるためには効率的な MSCs の培養方法の確立が必要である。そこで、増殖促進因子として我々はサイトカインに着目し、検証を行った。

方法: はじめに骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) を骨髄球系細胞と共培養することで得られる培養液上清が BMSCs の増殖に与える影響を評価した。続いて、その培養液上清中に高濃度に含まれるサイトカインを抗体アレイ分析でスクリーニングした。そして、抽出されたサイトカインを様々な組み合わせで培養液に添加して BMSCs を培養し、増殖および分化能に与える影響を評価した。

結果: BMSCs と骨髄球系細胞を共培養することで得られる培養液上清には、BMSCs の増殖促進効果があった。その培養液上清中には 19 種類の高濃度のサイトカインが含まれており、これらのサイトカインを通常培地に加えるのみで、BMSCs の増殖は促進された。さらに絞りこむことで、MIG と I309 の 2 種類のサイトカインが BMSCs の増殖を促進していることが明らかとなった。また、これら MIG と I309 を添加した培地で培養した BMSCs の分化能は維持されていた。

結論: MIG と I309 は BMSCs の分化能を維持しながら、増殖を促進する。この知見は、MSCs の効率的な培養方法の確立に貢献すると考えられる。

【背景・目的】

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells :MSCs)は脂肪細胞や骨細胞、軟骨細胞への分化能をもつ体性幹細胞であり、神経細胞や肝細胞などへも分化可能なことが報告されている¹⁻³⁾。またMSCsのもつ抗炎症作用や免疫調整能、サイトカイン分泌作用などは障害組織の再生に促進的に働くことが報告されており、再生医療の細胞源として注目されている⁴⁾。肝疾患においてもMSCsの治療効果を検証する研究が増えてきており、有効性が多く報告されてきている⁵⁻⁷⁾。

我々もこれまで、少量の自己骨髄液から培養した骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived MSCs : BMSCs)を使用した低侵襲な肝臓再生療法を開発し、その治療効果と安全性、および最適な細胞投与経路をイヌ肝硬変モデルで検証し報告している⁸⁻¹⁰⁾。

そして、その結果を受けて現在ヒトでの臨床試験を開始しているが、さらに治療効果をも高めるには、BMSCsをより効率的に培養することが必要である。そのため、我々はBMSCsを骨髄球分画細胞と共培養することで、より多くのBMSCsが培養できる培養皿を開発した(Japan patent JP2012-231788A)。また興味深いことに、この培養皿より得られる培養液上清のみだけでもBMSCsの増殖が促進されることを確認した。さらに、本研究では、その培養液上清中に含まれる2種類のBMSCsの増殖促進因子を同定したので報告する。

【方法】

〈細胞〉

本研究では、細胞はヒト骨髄単核球細胞(Human bone marrow mononuclear cells :

BMNCs. 2M-125D ; Lonza, Basel, Switzerland)と ヒト骨髄由来間葉系幹細胞

(human bone marrow-derived mesenchymal stem cells : BMSCs. PT-2501; Lonza) を

使用した。

〈細胞培養〉

ナノ物質ゲルと無機粘土で表面をコーティングした培養皿 (Dish X) 上、および何もコ

ーティングのされていない 通常培養皿 (Dish Y : Iwaki, Tokyo, Japan) 上に BMNCs

を 1×10^8 cells/cm² で播種し、10%ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA)と100μg/ml ゲンタマイシン(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を添

加したダルベッコ改変イーグル培地(Thermo Fisher Scientific-inc)を用いて温度37°C、

5%CO₂の条件下で培養を行った。培地交換は2日おきに行った。

それぞれ Day 7 の時点で培地上清を回収し、遠心分離(2,000g, 20min)にかけた。

Dish X より得られた上清を調整培地 X (培地 X), Dish Y より得られた上清を調整培

地 Y (培地 Y)とした。そして、24Well plate (Corning, NY, USA)に BMSCs (Lonza)を

5×10^3 cells/well で播種し、培地 X, Y を用いてそれぞれ温度37°C、5%CO₂の条件下

で4日間培養を行った (n=10 each)。

〈MTS アッセイ〉

MTS アッセイによる細胞増殖評価は、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。

〈サイトカイン試薬〉

MCP, MCP3, MIP 1 α , MIP 1 β , MDC, IL-6, IL-8, IL-10, M-CSF, MIG, I309, ENA 78, NAP 2 は Wako (Osaka, Japan)、RANTES, Eotaxin-2, GRO, uPAR, sgp130 は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、TIMP 1 は Pepro Tech inc (Rocky Hill, NJ, USA)より購入し使用した。

〈サイトカイン抗体アレイ解析〉

培地 X と培地 Y について、RayBio Human Cytokine Antibody Array G Series 1000 (RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA) を用いて、培地中のサイトカイン量を測定した。そして、培地 X において、培地 Y よりも Net intensity が 1.5 倍以上のサイトカインを抽出した。

〈サイトカイン添加培地での細胞増殖評価〉

10%ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich)と 100 μ g/ml ゲンタマイシン(Thermo Fisher Scientific)を含んだダルベッコ改変イーグル培地(Thermo Fisher Scientific)に、サイトカイン抗体アレイ分析で抽出されたサイトカイン 19 種類を添加した培地を Medium A、19 種のうち MIG、I309、IL-8、MIP-1 α の 4 種を加えた培地を Medium B、MIG と I309 の 2 種を加えた培地を Medium C、全 19 種類から MIG と I309 を除いた 17 種のサイトカインを添加した培地を Medium D とした。サイトカインを添加していない培地を Control medium とした。Cytokine の添加濃度はそれぞれの ED50 値の 1~10 倍とした(Table 1)。次に、BMSCs を 48Well プレートに 5×10^3 cells/well で播種し、Control medium で、温度 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の条件下で 24 時間培養した。24 時間後、細胞が接着したことを確認した後にサイトカインを添加した Medium A, B, C, D にそれぞれに培地交換した(n=6 each)。コントロール群に関しては、24 時間後に control medium に培地交換した。その後、温度 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の条件下で培養し、Incucyte zoom (Essen BioScience, AnnArbor, Michigan, USA)を用いて 1 時間おきに細胞が Well 底に占める割合を経時的に計測した。サイトカインを添加して 5 日間培養し、増殖曲線および MTS assay で増殖性を評価した。

Table 1 The addition concentration of cytokines

| | Cytokine | Concentration | ED50 |
|----------|----------------|----------------|----------------------|
| Medium A | MCP3 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | MIP-1 α | 100ng/ml | 1~10ng/ml |
| | RANTES | 300ng/ml | 20~30ng/ml |
| | MDC | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | MIP-1 β | 200ng/ml | 5~20ng/ml |
| | IL-6 | 1ng/ml | 0.1ng/ml |
| | MCP2 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | I-309 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | CCL24 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | GRO | 1.5 μ g/ml | 0.15~0.30 μ g/ml |
| | uPAR | 100 μ g/ml | 5~10 μ g/ml |
| | IL-8 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | M-CSF | 10ng/ml | 1ng/ml |
| | NAP-2 | 100ng/ml | 1~10ng/ml |
| | MIG | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | IL-10 | 20ng/ml | 2ng/ml |
| | sgp130 | 1 μ g/ml | 0.5~1 μ g/ml |
| | TIMP1 | 1 μ g/ml | 0.5 μ g/ml |
| ENA-78 | 100ng/ml | 5~10ng/ml | |
| Medium B | MIP-1 α | 100ng/ml | 1~10ng/ml |
| | I-309 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | IL-8 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | MIG | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| Medium C | I-309 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | MIG | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| Medium D | MCP3 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | MIP-1 α | 100ng/ml | 1~10ng/ml |
| | RANTES | 300ng/ml | 20~30ng/ml |
| | MDC | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | MIP-1 β | 200ng/ml | 5~20ng/ml |
| | IL-6 | 1ng/ml | 0.1ng/ml |
| | MCP2 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | CCL24 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |

| | | | |
|--|--------|----------|----------------|
| | GRO | 1.5µg/ml | 0.15~0.30µg/ml |
| | uPAR | 100µg/ml | 5~10µg/ml |
| | IL-8 | 500ng/ml | 10~100ng/ml |
| | M-CSF | 10ng/ml | 1ng/ml |
| | NAP-2 | 100ng/ml | 1~10 ng/ml |
| | IL-10 | 20ng/ml | 2ng/ml |
| | sgp130 | 1µg/ml | 0.5~1µg/ml |
| | TIMP1 | 1µg/ml | 0.5µg/ml |
| | ENA-78 | 100ng/ml | 5~10ng/ml |

NOTE; MCP2: Monocyte chemoattractant protein-2, MCP3: Monocyte chemoattractant protein-3, MIP 1 α : Macrophage inflammatory protein 1 α , MIP 1 β : Macrophage inflammatory protein 1 β , MDC: Macrophage derived chemokine, IL-6: Interleukin-6, IL-8: Interleukin-8, IL-10: Interleukin-10, M-CSF: Macrophage colony stimulating factor, MIG: Monokine induced by interferon- γ , ENA78: Epithelial-derived neutrophil-activating protein78, NAP2: Neutrophil Activating Protein 2, RANTES: Regulated on activation normal T cell expressed and secreted, GRO: Growth related oncogene, uPAR: Urokinase-type plasminogen activator receptor, sgp130: Soluble Glycoprotein 130, TIMP1: Tissue inhibitor of metalloproteinase1.

〈分化能アッセイ〉

脂肪細胞への分化誘導は、A Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification-Kit (R&D Systems)を用いて行った。Medium C および Control medium で BMSCs を培養し、100% confluence となった時点で脂肪分化誘導 Medium へ培地を交換した。14 日間の培養後、Oil red O 染色を施行し、各細胞内の脂肪滴の出現を顕微鏡で確認した。

〈統計解析〉

統計解析は 2 群間の比較には student の t 検定を用いて行い、3 群以上の比較には one-way ANOVA 後の Tukey 検定を用いて行った。p < 0.05 を統計学的有意差とした。データ値は平均値±標準偏差で表示した。

【結果】

〈骨髓球系細胞との共培養により、BMSCs の増殖は促進された〉

Dish X では表面のコーティングにより、接着細胞のみではなく骨髓球系細胞といった非接着細胞も同時に培養することが可能であった。一方で、コーティングのされていない Dish Y では BMNCs を培養すると培地交換の過程で非接着細胞は除去されるため、MSCs を中心とする接着細胞のみしか培養できなかった (Fig. 1a)。

また、それぞれの培養皿での BMNCs 培養液上清から調整した Medium X、Medium Y を用いて BMSCs を培養し MTS assay で増殖性を評価したところ、骨髓球系細胞と共培養して得られた Medium X で BMSCs を培養した方が有意に高い増殖性を示した。この結果より、Medium X に細胞増殖を促進する因子が存在することが示唆された。(Fig.1b)

Fig.1

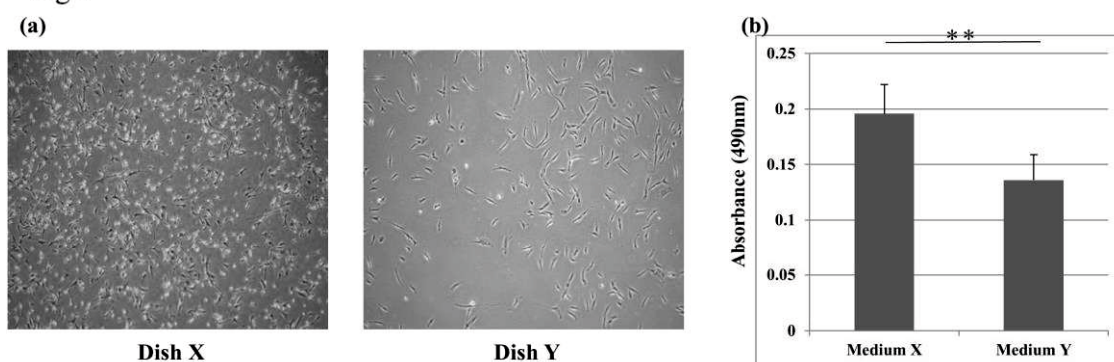


Fig.1 培養皿上での BMNCs の培養、および各培養皿での Medium 上清を用いた BMSCs の培養。(a) Dish X と Dish Y に BMNCs を播種し、Day 7 時点での各培養皿上の細胞の顕微鏡像 ($\times 40$ magnification)。 (b) MTS assay での BMSCs の

細胞増殖評価。BMSCs を Medium X, Medium Y を用いて 4 日間培養を行い、

MTS assay を施行した。(n=10 each , *p < 0.05)

〈培養上清のサイトカイン抗体アレイ分析結果〉

Medium X と Medium Y のサイトカイン濃度に変化がないかサイトカイン抗体アレイ分

析でスクリーニングしたところ、Medium X には、Medium Y と比較して、19 種類の

Cytokines が高濃度(1.5 倍以上)に含まれていることが明らかになった(Table2)。

Table 2 Cytokine antibody array analysis results

| Cytokine | Net intensity (Medium X) | Net intensity (Medium Y) | Net intensity ratio |
|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| MCP3 | 54141.31 | 619.26 | 88.74 |
| MIP-1 α | 45374.43 | 525.39 | 86.27 |
| RANTES | 954.82 | 39.54 | 25.14 |
| MDC | 2262.52 | 114.57 | 19.71 |
| MIP-1 β | 25034.14 | 1672.28 | 14.96 |
| IL-6 | 44012.18 | 4349.78 | 10.12 |
| MCP2 | 1087.69 | 130.60 | 8.35 |
| I-309 | 364.86 | 56.34 | 6.49 |
| CCL24 | 712.62 | 129.55 | 5.51 |
| GRO | 4360.48 | 934.14 | 4.67 |
| uPAR | 1005.71 | 247.30 | 4.05 |
| IL-8 | 1525.89 | 539.74 | 2.82 |
| M-CSF | 215.73 | 89.17 | 2.48 |
| NAP-2 | 496.07 | 200.48 | 2.47 |
| MIG | 678.31 | 358.74 | 1.89 |
| IL-10 | 817.19 | 460.72 | 1.77 |
| sgp130 | 442.00 | 229.92 | 1.74 |
| TIMP1 | 1321.80 | 825.79 | 1.60 |
| ENA-78 | 260.73 | 166.55 | 1.55 |
| | | | |

〈サイトカインアレイ解析で高濃度であったサイトカインの添加により、BMSCs の増殖は促進された〉

これら 19 種類の Cytokines をそれぞれの ED50 値の 1~10 倍濃度で添加した Medium を Medium A とし、BMSCs を培養したところ、Cytokine を添加しないコントロール培地と比較し増殖曲線では明らかに増殖速度が速く、また MTS assay での評価でも有意に増殖性の上昇を認めた (Fig.2a, 2b)。また、細胞の形態にも変化は認めなかった(Fig. 2c)。続いて、19 種類の Cytokines の中から 4 種類の Cytokines (MIG、I309、IL-8、MIP-1 α)を選択し添加した Medium B でも Medium A と同等の細胞増殖促進効果があることを確認した(Fig. 3a)。さらに Cytokine を絞り込み、2 種類の Cytokines (MIG、I309)を添加した Medium C においても BMSCs の増殖性は Medium A および Medium B と同等であった (Fig. 3b, 3c)。また、Medium A から MIG,I309 を除いた Medium D では BMSC の増殖性は促進されなかった (Fig. 3d)。さらに、MIG のみ、または I309 のみを添加した Medium を Medium C および Control medium と比較したところ、どちらも Control medium より増殖性は促進されたものの、Medium C と比較すると有意に増殖性は劣っていた (Fig. 3e)。以上より、MIG と I309 の 2 種類の Cytokine を培地に加えることで、BMSCs を効率的に培養することが可能であることが明らかになった。

Fig.2

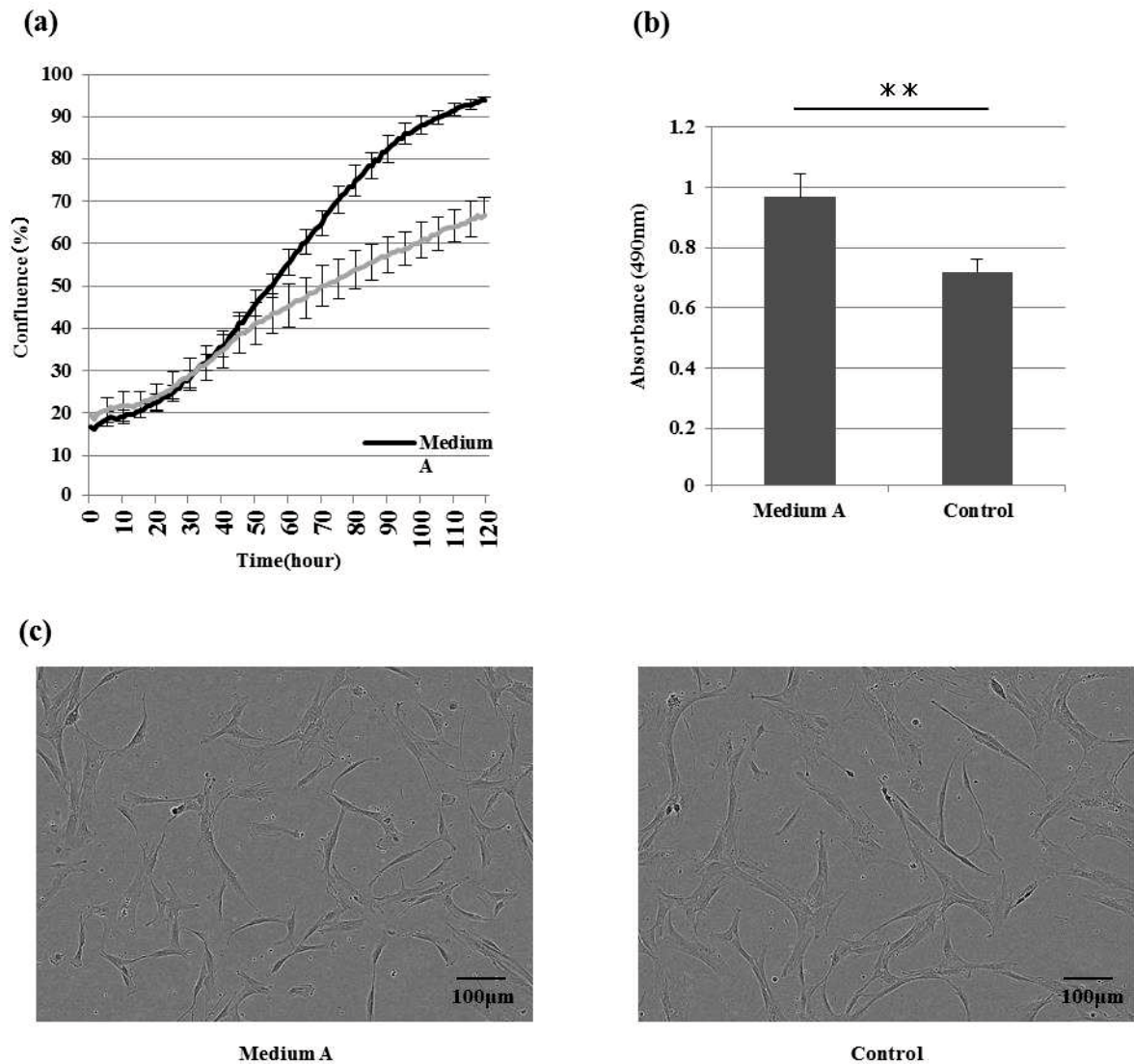
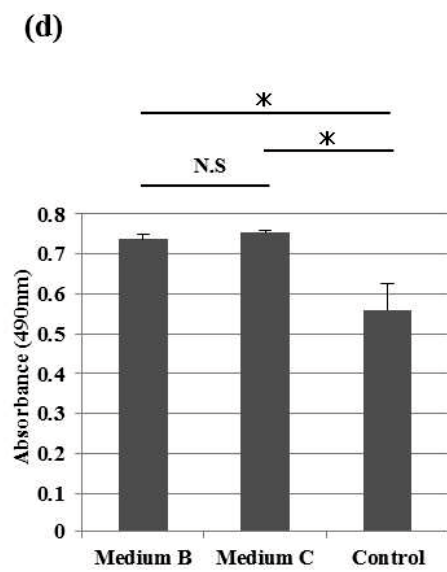
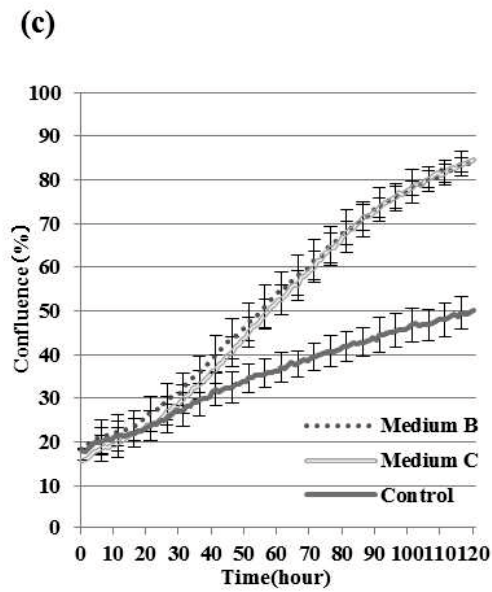
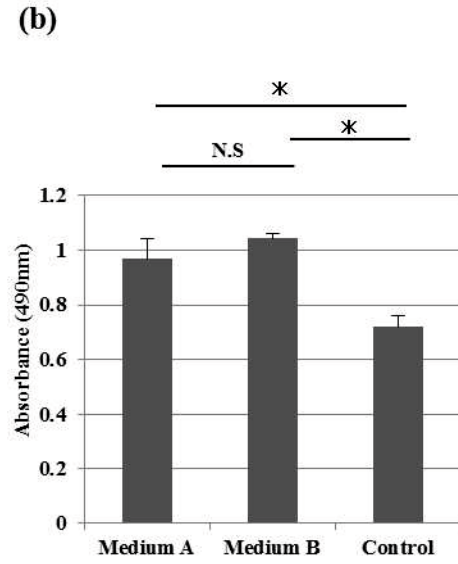
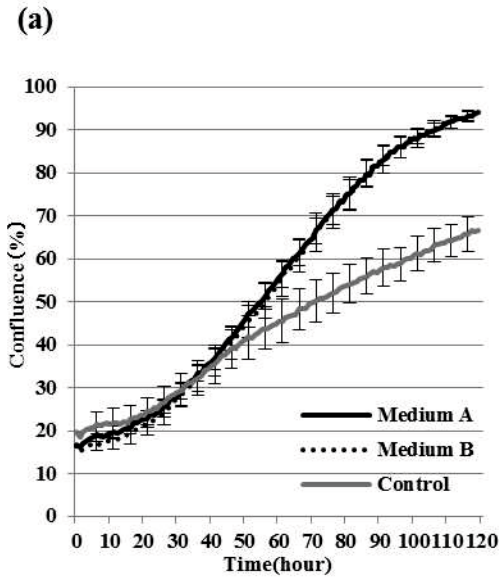
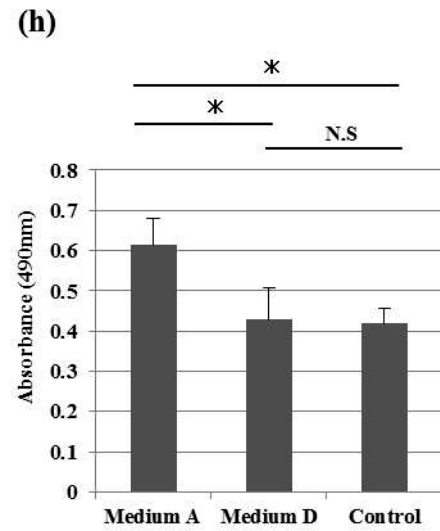
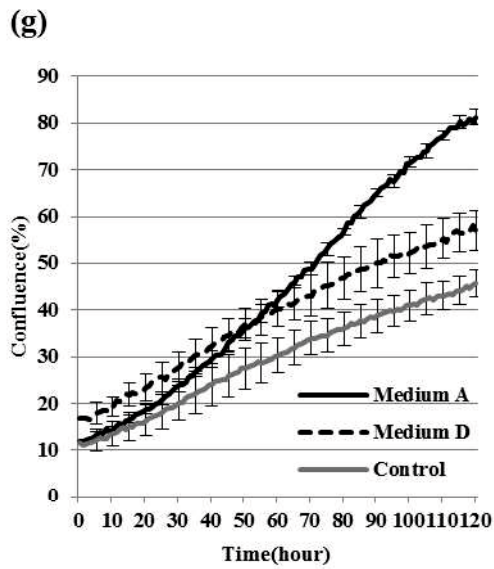
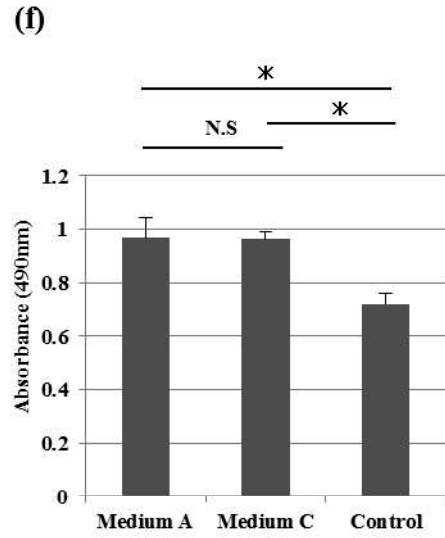
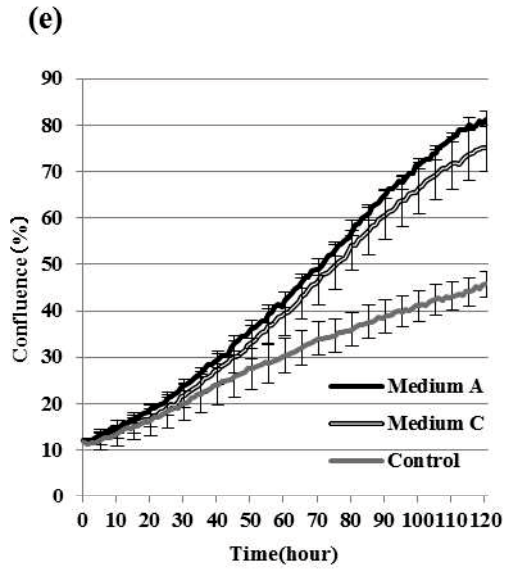


Fig 2. BMSCs をサイトカイン添加 Medium で培養した際の増殖性および細胞形態評価。(a) BMSCs を Medium A および Control medium で培養した際の増殖曲線(n=6 each , *p < 0.05)。(b) MTS assay による増殖評価。Medium をサイトカイン添加 Medium に交換して 5 日間培養の後、MTS assay を施行した(n=6 each , *p < 0.05)。(c) Day 5 時点での各 Well 上の細胞の顕微鏡像 (×100 magnification)。

Fig.3





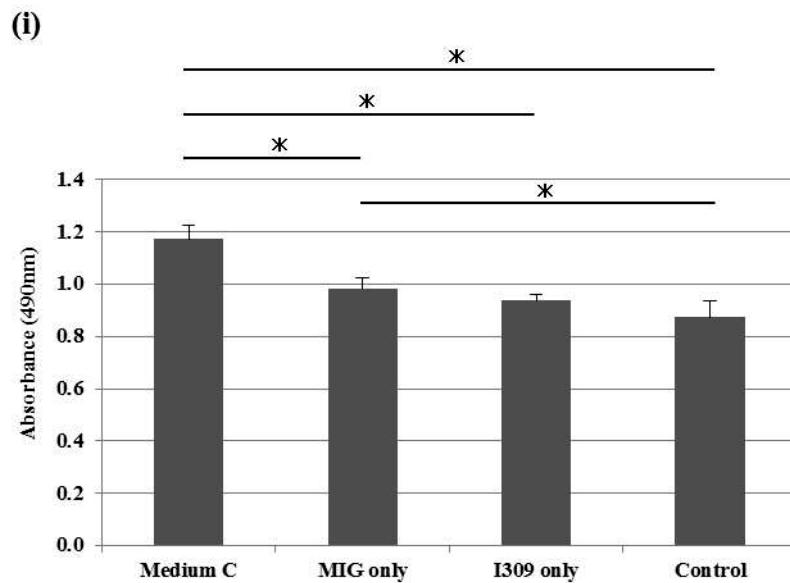


Fig.3 BMSCsを各サイトカイン添加Mediumで培養した際の増殖性評価。BMSCsをControl mediumで24時間培養した後、それぞれサイトカイン添加Mediumに培地交換した。Medium交換後5日間培養を行い、増殖性を評価した。(a)(b) Medium AおよびMedium B、Control mediumで培養した際の増殖曲線とMTS assayでの増殖評価(n=6 each, *p < 0.05)。(c) (d) Medium BおよびMedium C、Control mediumで培養した際の増殖曲線とMTS assayでの増殖評価(n=6 each, *p < 0.05)。(e) (f) Medium AおよびMedium C、Control mediumで培養した際の増殖曲線とMTS assayでの増殖評価(n=6 each, *p < 0.05)。(g) (h) Medium AおよびMedium D、Control mediumで培養した際の増殖曲線とMTS assayでの増殖評価(n=6 each, *p < 0.05)。(i) Medium CおよびMIGのみ添加したMedium、I309のみ添加したMedium、Control mediumで培養した際のMTS assayでの増殖評価(n=6 each, *p < 0.05)。

〈MIG と I309 を添加して培養した BMSCs も脂肪細胞への分化が可能であった〉

MIG と I309 を添加した Medium C で培養することで BMSC の分化能に影響がないか、脂肪細胞への分化誘導で確認した。その結果、Medium C で培養した BMSCs も Control medium と同等に脂肪細胞への分化が可能であった (Fig. 4)。これより、MIG と I309 の添加は BMSCs の分化能に影響を与えることはないことが確認された。

Fig.4

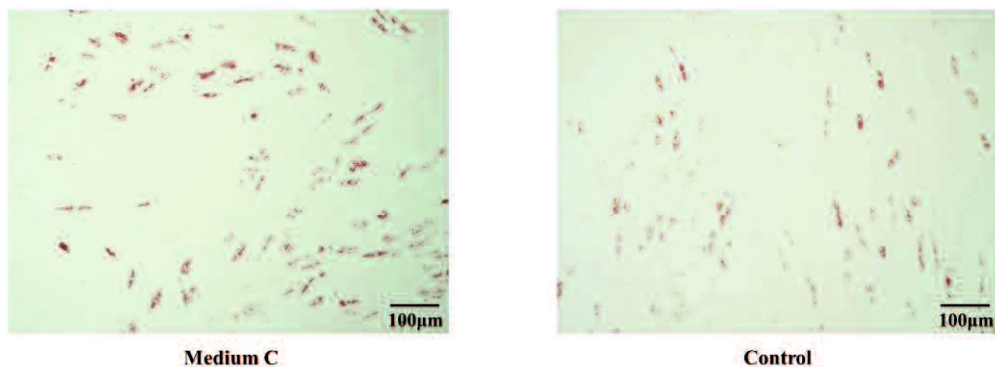


Fig.4 Medium C および Control medium で BMSCs を培養し、100% confluence となった時点で脂肪分化誘導 Medium へ培地を交換した。7 日間の培養後、Oil red O 染色を施行し、各細胞内の脂肪滴の出現を顕微鏡で確認した (×100 magnification)。

【考察】

今回、我々は BMNCs を非接着細胞である骨髄球系細胞も含めて同時に培養することで得られる培養上清に、BMSCs の増殖を促進する効果があることを確認した。そして、その培養上清中のサイトカインをアレイ解析でスクリーニングし、19 種類のサイトカインが高濃度で含まれていること、およびそれらサイトカインを培地に添加することで、骨髄球系細胞との共培養で得られる培養上清と同様に BMSCs の増殖が促進されることを見出した。さらに、それら 19 種類のサイトカインから 1 種類ずつサイトカインを除いて BMSCs を培養し、増殖性に影響を与えなかったサイトカインは除外するという方法で絞り込みを行い、最終的に MIG と I309 の 2 つのサイトカインが BMSCs の増殖性を促進する因子であることを同定した。そして、それらサイトカインで培養した BMSCs は脂肪細胞への分化能が維持されていることも確認した。

I309 は CC chemokine ligand 1(CCL1)とも呼ばれるケモカインであり、monocytes や activated T-lymphocytes、endothelial cells から産生される¹¹⁻¹²⁾。そして、lymphocytes、特に T-lymphocytes の migration を誘導すると言われている¹³⁻¹⁴⁾。また、Regulatory T cells (Treg)の細胞増殖を促進することや¹⁵⁾、Treg を誘導することで cytotoxic T cell を抑制し、腫瘍の進行を促進すると報告されている¹⁶⁻¹⁷⁾。MIG は CXC chemokine ligand 9 とも呼ばれるケモカインであり、IFN γ の刺激により macrophages, monocytes, neutrophils, antigen presenting cell, B cells and eosinophils から産生される¹⁸⁾。そして、

Tリンパ球細胞を炎症や感染部位へ誘導し、Tリンパ球細胞の増殖を促進することも報告されている¹⁸⁻¹⁹⁾。これまでIL 22やTNF α といったサイトカインがMSCsの増殖を促進するという報告はあるが²⁰⁻²¹⁾、MIGとI309がMSCsの増殖を促進するという報告はなく、初めての報告と思われる。

MIGとI309がMSCsの増殖を促進するメカニズムは明らかではないが、これまで、NF-kB path wayの活性化や²¹⁾、酸化ストレスの軽減²²⁾、Wnt3a signaling path way²³⁾がMSCsの増殖を促進すると報告されており、これらの機序が関与している可能性はある。また、MIGとI309それぞれ単独での添加培地でも、Control mediumと比べBMSCsの増殖性はある程度促進されたが、MIGとI309をともに添加することでさらに有意な増殖性の向上が認められた。この結果より、BMSCs増殖促進効果においてMIGとI309の間でSynergy効果があることも想定される。これらメカニズムの解明のため、今後さらなる検証実験が必要である。

また、本実験はIn vitroでの検証であり、MIGとI309で培養したMSCsの治療効果の検証はできていない。今後、ヒトへ臨床応用するためには、In vivoでの実験により、その治療効果や安全性を評価する必要がある。

【結語】

今回我々は MIG と I309 が BMSCs の分化能を維持しながら、増殖を促進することを明らかにした。この知見は、MSCs の効率的な培養方法の確立に貢献すると考えられる。

【謝辞】

実験に協力頂いた山田磨理子氏、大田久美江氏、望月里紗氏に感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会科学研究費 JP26461009 の助成を受けた。

【参考文献】

- (1)Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* , 284(5411):143-7, 1999.
- (2)Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., et al. : Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin .Invest.* ,113(12):1701-10, 2004.
- (3) Lee, K.D., Kuo, T.K., Whang-Peng, J., Chung, Y.F., Lin, C.T., Chou, S.H., et al. : In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*.,40(6):1275–1284, 2004.
- (4) Squillaro, T., Peluso, G., Galderisi, U. : Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.*, 25(5):829-48, 2016.
- (5) Cho, K.A., Ju, S.Y., Cho, S.J., Jung, Y.J., Woo, S.Y., Seoh, J.Y., et al. : Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell. Biol. Int.*, 33(7): 772–777, 2009.

- (6) Eom, Y.W., Shim, K.Y., Baik, S.K. : Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J. Intern. Med.* ,30(5):580-9, 2015.
- (7) Suk, K.T., Yoon, J.H., Kim, M.Y., Kim, C.W., Kim, J.K., Park, H., et al. : Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology.* 64(6): 2185–2197, 2016;.
- (8) Quintanilha, L.F., Takami, T., Hirose, Y., Fujisawa, K., Murata, Y., Yamamoto, N., et al. : Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatol Res.* 44(10): E206–217, 2014.
- (9) Matsuda, T., Takami, T., Sasaki, R., Nishimura, T., Aibe, Y., Paredes, B.D., et al. : A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatol Commun.* 1(7): 691–703, 2017.
- (10) Nishimura, T., Takami, T., Sasaki, R., Aibe, Y., Matsuda, T., Fujisawa, K., et al. : Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. *PLoS One.* 14(1):e0210588, 2019.
- (11) Miller, M.D., Hata, S., De, Waal, Malefyt, R., Krangel, M.S.: A novel polypeptide secreted by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 143(9): 2907–2916, 1989.

- (12) Haque, N.S., Zhang, X., French, D.L., et al. : CC chemokine I-309 is the principal monocyte chemoattractant induced by apolipoprotein(a) in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 102(7):786–792, 2000.
- (13) Roos, R.S., Loetscher, M., Legler, D.F., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. : Identification of CCR8, the Receptor for the Human CC Chemokine I-309. *J. Biol. Chem.* 272(28):17251-17254, 1997.
- (14) Selvan, R.S., Zhou, L.J., Krangel, M.S. : Regulation of I-309 gene expression in human monocytes by endogenous interleukin-1. *Eur. J. Immunol.* 27(3): 687–694, 1997.
- (15) Haque, N.S., Tuteja, A., Haque, N. : CC chemokine CCL1 receptor CCR8 mediates conversion of mesenchymal stem cells to embryoid bodies expressing FOXP3+CCR8+ regulatory T cells. *PLoS One*. 14(7):e0218944, 2019.
- (16) Plitas, G., Konopacki, C., Wu, K., et al. : Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer. *Immunity*. 45(5):1122-1134, 2016.
- (17) Ohue, Y., Nishikawa, H. : Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.* 110(7):2080-2089, 2019.

(18) Whiting, D., Hsieh, G., Yun, J.J., Banerji, A., Yao, W., Fishbein, M.C., et al. :

Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J. Immunol.* 172(12): 7417-24, 2004.

(19) Berthoud, T.K., Dunachie, S.J., Todryk, S., Hill, A.V., Fletcher, H.A.: MIG

(CXCL9) is a more sensitive measure than IFN- γ of vaccine induced T-cell responses in volunteers receiving investigated malaria vaccines. *J. Immunol. Methods.* 340 (1):33–41, 2009.

(20) El-Zayadi, A.A., Jones, E.A., Churchman, S.M., Baboolal, T.G., Cuthbert,

R.J., El-Jawhari, J.J. : IL-22 drives the proliferation, migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: A novel cytokine that could contribute to new bone formation in SpA. *Rheumatology (Oxford).* 56(3):488-493, 2017.

(21) Shioda, M., Muneta, T., Tsuji, K., Mizuno, M., Komori, K., Koga, H., et al. :

TNF α promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. *PLoS One.* 12(5):e0177771, 2017.

(22) Zhang, J., Peng, C.A. : Enhanced proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by astaxanthin-encapsulated polymeric micelles. *PLoS One.* 14(5):e0216755, 2019.

(23)He, X., Wang, H., Jin, T., Xu, Y., Mei, L., Yang, J. : TLR4 Activation Promotes Bone Marrow MSC Proliferation and Osteogenic Differentiation via Wnt3a and Wnt5a Signaling. *PLoS One*. 11(3):e0149876, 2016.