

免疫性腎炎に対するDFAT細胞療法の治療効果と作用機序の検討

阿部雅紀¹⁾, 丸山高史¹⁾, 逸見聖一郎¹⁾, 松本太郎¹⁾, 加野浩一郎²⁾

Evaluation of effects and mechanism of the dedifferentiated fat cell therapies for the immune-induced nephritis

Masanori ABE¹⁾, Takashi MARUYAMA¹⁾, Seiichiro HEMMI¹⁾,
Taro MATSUMOTO²⁾, Koichiro KANO³⁾

要旨

今回我々は腎疾患の中でも特に生命予後の悪いANCA関連腎炎について、本学で開発され間葉系幹細胞の性質を有する脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT) を用いた治療の効果と作用機序について検証した。その結果、生存率、採血・尿・組織所見の改善と安全性についても確認された。治療改善のメカニズムとして、免疫調整作用を有するTSG6の発現亢進がDFAT細胞移植後惹起され、ANCA関連腎炎の病因である自己免疫異常が改善されたためと考えられた。更にその後の検証から病態改善の機序として、DFAT由来のエクソソームによる病態改善の可能性が考えられ、今後臨床応用できる可能性が示唆された。現在までに得られた結果をまとめて以下に報告する。

1. はじめに

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させDFATを得る技術を開発、特許化した(特願平10-378013)。DFATは再生医療の移植細胞原として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた¹⁾。この間葉系幹細胞は他にも体内に障害が起きた際に障害部位に集積して障害部位を修復するのに寄与するという報告が散見されており、これを応用してこの間葉系幹細胞を体内に移植して様々な疾患を治療する試みが基礎実験のみならずヒトにおいても脳梗塞治療などに既に臨床応用され始めている。間葉系幹細胞は一般に骨髓細胞などから作製されるがその過程の侵襲も強くまた一度の処理で得られる間葉系幹細胞も限られたものである。これに対してDFATは間葉系幹細胞と同等の性質を持ちながら局所麻酔下に1gの脂

肪組織を採取出来れば細胞の性質上、その後大量調製が可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全や高齢患者からも採取・調製が可能である。さらにまた癌化などのリスクも他の移植細胞原と比べても格段に少なく、まとめると安価で安全かつ低侵襲の手技によって大量調整が可能であり、間葉系幹細胞による疾患治療の移植細胞原として非常に期待の持てる治療ツールである。腎臓疾患は一度罹患すると根治治療が難しく病態が慢性化する場合も珍しくない。高血圧や糖尿病、糸球体腎炎など腎臓病の原因疾患には様々な疾患があるが、それらをまとめて慢性腎臓病 (CKD : Chronic Kidney Disease) と呼ぶ。この疾患は現在1330万人の患者が本邦に存在して、都合国民8人に1人か何らかの腎疾患に罹患している事になるが根治療法が十分でないのが現状である。根治療法が十分でないため透析患者数の増加にもつながり医療費の高騰など社会問題

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

2) 日本大学医学部機能形態細胞再生・細胞移植学分野

3) 日本大学生物資源科学部

阿部雅紀 : abe.masanori@nihon-u.ac.jp

化している。腎疾患の増加は高齢化や様々な医療技術、治療の進歩の裏返しとも言えるが、このような現状から腎臓病に対する治療法の更なる発展、開発が期待されている。また一部の腎疾患においては透析導入といった問題にとどまらず生命の危機に関係する、つまり生命予後の悪い腎疾患も存在する。

そのような背景の中、慢性腎疾患の中でも特に生命予後の悪いANCA関連腎炎について、本学で開発された間葉系幹細胞の性質を有するDFATを移植する細胞治療の効果と作用機序について検証した。

これまで我々は平成27年～29年度の科学研究費(15K09280)助成事業「進行性腎障害に対するDFATを用いた細胞移植治療の開発」にて自己免疫性腎炎がDFAT移植により改善し、その作用機序として免疫抑制作用にTSG-6の発現が関与している事を見出した²⁾。更に平成30～令和2年度の科研費(18K08255)助成事業によりANCA腎炎がDFAT移植で改善する事を見出した。病態改善の更なる詳細な機序として抗炎症物質TSG6の発現やマクロファージのM1からM2へ形質転換による抗炎症物質産生等、移植による免疫調整作用が機序として考えられた。しかしDFAT細胞移植において静脈投与されたDFATは殆ど肺にトラップされ、障害臓器の腎臓への集積は確認されず、DFATと障害臓器である腎臓と直接の細胞間インターアクションがない環境で上記のような現象がどのように見られているのか、細胞分子レベルでは依然不明のままであった。

一方、興味深いデータとして我々の研究室のデータとして、このDFATの培養上清中に細胞間コミュニケーションに関与するエクソソームが高純度に確認され、その内部にTリンパ球の増殖抑制や制御性T細胞分化抑制に関わるとされるmiRNAが確認され、DFATの分泌するエクソソームは種々の免疫調整作用を有するという結果を得た。その内容としてT細胞の増殖を制御する作用が報告されているmiRNA-20a-5p, miRNA-17-5p, ナイーブT細胞から制御性T細胞の分化誘導するmiRNA-26a-5p, miRNA-100-5p, Th17細胞への分化誘導を抑制するmiRNA-20b-5pの発現をエクソソーム内に確認している。

このin vitroの結果から考えて、in vivoにおいてもDFAT移植がエクソソームという液性因子を通じて免疫調整を発揮する可能性は十分にある。本研究ではDFAT投与による病態改善の機序についてエクソ

ソームを含め改めて検証するとともに、抽出されたエクソソームのみの投与で細胞投与と同等に病態が改善するかを検証して、将来の慢性腎臓病治療の開発の一助となることを目的とする。

2. 対象及び方法

ANCA関連腎炎のモデル動物であるSCG/ThpNkcマウスにDFATを経静脈的に細胞移植を行い、その改善効果を再検証した。さらにDFAT細胞移植による腎炎改善の機序を解明するため、移植後マウス血液中のエクソソームを抽出してmiRNAの発現を網羅的に行い、腎炎を改善させるmiRNAの検討を行った。またDFAT培養上清中のエクソソームをSCGマウスに投与して同様に効果が得られるかを検証した。以下その具体的方法を簡潔に記す。

1) DFATの作製

ddyマウスの皮下脂肪を採取してコラゲナーゼで処理し、低速遠心で得られた均一成熟脂肪細胞を20%ウシ胎仔血清含有DMEMで満たした天井側で培養する。DFATのコロニーが形成される培養7日頃にフラスコを反転し、通常の付着培養を行うことによりDFATは急速に増殖し1週間後に凍結保存して後の実験用に保存する。

2) 実験に使用するSCG/ThpNkcマウスの繁殖

SCG/ThpNkcマウスは他のマウスと違い、生命力の弱いマウスである。発売元である、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の疾患モデル小動物研究室は大阪にあり輸送が必要であった。そのため同マウスを輸送後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸送後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約8週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症して雌親の授乳が困難であるため、健常マウスとしてddyマウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5週齢のSCG/ThpNkcマウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出した。繁殖では1回の繁殖で約5頭の出産が予想される事から、実験に使用する41頭を得るためにはメス9頭の交配が必要となった。

3) DFATの細胞移植

7週齢のSCG/ThpNkcマウスにddyマウス由来DFATをそれぞれ 1×10^6 個/頭、 1×10^5 個/頭、 $1 \times$

10⁴個/頭の割合で各4頭ずつ静脈より細胞移植を行った。更に移植後の体内分布を検討する為、PKH26GLでラベルしたDFATを10⁵個/頭の割合で移植した。

4) 移植後の評価項目

細胞移植後1カ月飼育した。その間1週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。

5) 移植による治療効果、作用機序の検証

移植1カ月後、ddyマウス由来DFATを移植した群では生化学的検査として血液中のBUN, Cre, ANCA, ANA, WBC, CRP, IL-1, 6, 8, TNF- α , TSG-6濃度をELISA法で測定した。腎臓と肺についてReal-time PCR解析, Western blot法を用いて免疫制御分子としてTSG-6・IDOを, Th1-type cytokineとしてIFN- γ ・TNF- α を, M1マクロファージ関連サイトカインとしてMCP-1・IL-6・IL-12をM2マクロファージ関連サイトカインとしてCCL17・IL-4・IL-10・mannose receptorの発現の変化を観察した。これによりDFAT細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを考察した。

6) 移植による安全性の検証

移植後の代表的な副作用として、免疫毒性を機序とする移植片対宿主病 (GVHD) がある。この症状として代表的な皮膚病変 (手のひらや足の裏, 四肢や体幹の赤い斑点の有無, 全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ, 脱落の有無), 消化器病変 (食欲低下, 嘔吐, 下痢等), 肝臓病変 (黄疸や意識障害) などが移植後の実験動物に診られないか注意深く観察した。以上の結果を踏まえて免疫性腎炎へのDFAT細胞移植療法について効果の有無や作用機序, 免疫毒性を中心とした安全性について多角的に判断した。DFAT投与細胞数, DFAT投与期間などの細胞治療としてのデータを蓄積し, DFAT移植の最適治療条件を確立した。

7) 更なる作用機序, エクソソームについての検証

DFATから分泌されるエクソソームについて実験計画について以下の通りとした。

in vitro の系としてDFATを培養してその培養上清中においてサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてエクソソームの回収を行った。培養上清 (DMEM) 15mlを15ml tubeで4℃, 1500g, 15~30分遠心, 15ml tubeの上清2mlを2ml tube (1Sample 各9本)

へ移し, 4℃, 10000g, 10分遠心, Amicon限外濾過フィルター (Cut off100kDa) を用いて, MilliQ Water 15mlをいれて4000g, 10分遠心し, フィルターの前処理を行い, 100kDa Amicon Ultra-15にc) の15ml DFAT培養上清を加えた。以上より得られたDFAT培養上清濃縮液 0.5mlをqEVカラムの上から注入し抽出した。メイワフォーシス株式会社のナノ粒子マルチアナライザーを使用して培養上清, 血清中, 肺組織, 腎組織中のmiRNAについて測定を行った。

in vivo の系として以下のとおり施行した。移植1カ月後, メイワフォーシス株式会社製のqEVオートマチックフラクションコレクター (AFC) およびエクソソーム抽出キット (qEV) を用いて血液のエクソソームを抽出した。それがエクソソームであることを確認するために走査電子顕微鏡による観察と, ウェスタンブロット法によるエクソソーム特異的マーカーであるCD63のバンドについて確認した。エクソソームの存在を確認後, SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit (SBI, SeraMir) を用いてtotal RNAを抽出し, バイオアナライザ (Bioanalyzer RNA6000 Pico) でtotal RNAの解析, 並びにAgilent Technology社製のオリゴDNAマイクロアレイを用いてmiRNAについて我々の予備実験の結果を始め更に網羅的解析を行った。得られたmiRNAをリアルタイムRT PCR法を用いてその発現を確認した。

3. 結果

移植後のDFATの体内分について, PKH26GLでラベルしたDFATは投与後1時間においてDFATの肺でのトラップが確認され, その他の臓器への分布は認めなかった。間葉系幹細胞が傷害臓器に集積して傷害臓器が修復される内容の既報があるため, 腎臓の周囲または腎臓の内部にDFATの存在が見られることを予想していたが, 静脈注射されたDFATはほぼすべてが肺にトラップされている結果であった (図1)。肺の抹消血管径とDFATの細胞径は後者の方が大きく物理的に肺を通過することが理論的には不可能であるが, 既報では同様の実験で障害の腎臓に間葉系幹細胞が集積していると報告しているものが散見されるが, 我々の結果はその限りではなかった。その後1週間, 2週間と徐々に肺にトラップされDFAT数は減少していったが, この間その他の臓

器への移行は認めなかった。

移植細胞数については 1×10^5 個/頭の割合で投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下データはDFATを 1×10^5 個/頭の割合で投与した結果について述べる。生存率についてはDFATを移植した群が治療4か月後100%だったのに対して移植しなかった疾患群が66%と低下しており、移植したことによる生存率の改善を認めた(図2)。蛋白尿については腎炎群よりもDFAT投与群の方が蛋白尿の改善を認めた。腎臓組織の評価として、組織GIS(糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT投与群で有意な低下を認めた($P=0.018$)(図3)。一方、尿細管の障害度を表す指数であるTISでは腎炎群およびDFAT投与群において有意な差は認めなかった。腎機能の評価として、血清BUN値と血清Cr値について腎炎群とDFAT投与群で差を認めなかった。また

ANCA腎炎発症時に上昇する血清MPO-ANCA値は腎炎群と比較し、DFAT投与群で低下傾向であったが、有意な差は認めなかった。腎臓でのTSG-6のmRNA発現は腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現の亢進($P=0.041$)を認めた。TSG-6の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群とDFAT投与群で糸球体において同等であった。一方、腎間質でのTSG-6の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両方において亢進を認めた。またCD44の発現は、DFAT投与群で低下傾向であった。免疫調整物質であるIL-10の発現はDFAT投与群で増加傾向であり、PGE2の発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向であった。IL-1 β の発現は両群で差を認めず、TNF- α の発現は腎炎群と比較しDFAT投与群で低下傾向であった(図4)。またM1マクロファージのケモカインであるMCP-1の蛋白発現は、腎炎群

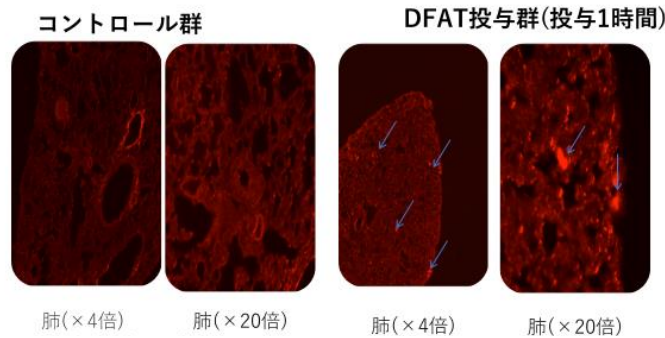


図1 移植されたDFATの体内分布

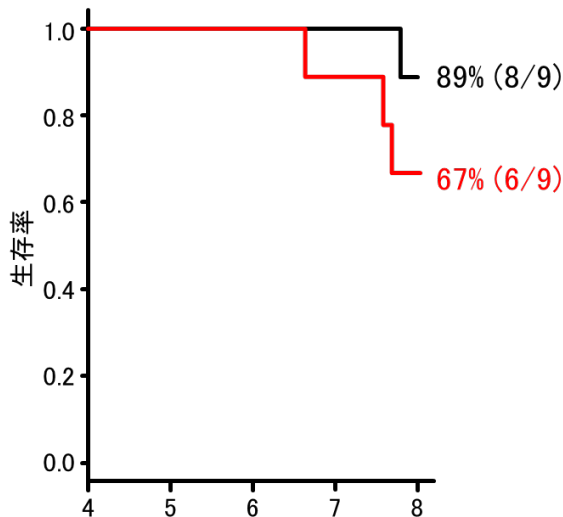


図2 DFAT移植後の生存率(赤；疾患群、黒；治療群)

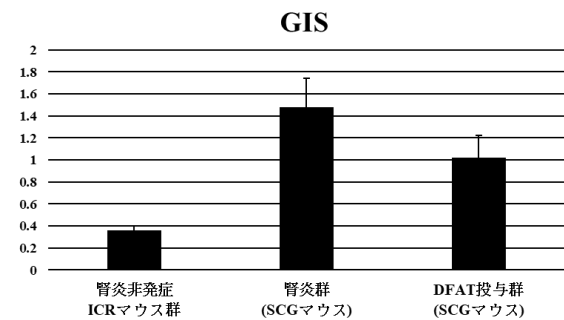


図3 治療後の糸球体障害指数 (GIS)

と比較し、DFAT投与群において有意な発現低下 ($P=0.04$) を認めた (図5)。M2マクロファージに発現するケモサイトカインであるCCL17の蛋白発現は、腎炎群と比較してDFAT投与群で有意な発現亢進 ($P = 0.04$) を認めた (図6)。real-time PCR 法でICAM, VCAMにおいては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞におけるActivated Tregの発現は両群に有意差を認めなかった。ここまでの結果をまとめると移植された間葉系幹細胞と類似するDFATが免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつTSG-6の発現亢進と、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。

またDFATについての催奇形性であるが、肺にはDFATがトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点でのDFATによる催奇形性は認められなかった。

移植による免疫毒性の一種であるGVHDを考える手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無といった皮膚病変や、食欲低下、嘔吐、下痢等の消化器病変、黄疸や意識障害といった消化器病変などが移植後観察されることは無かった。

これらより、DFATの細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果、副作用の両面から考えても臨床応用が可能であることが示唆されたと考えた。

エクソソームについての結果を以下に記す。DFATの培養上清中や治療マウスの血清内にエクソソームについて検討した。SEC法による細胞外小胞抽出キット (qEV) でDFAT培養上清中のエクソソームを回収した結果、 6.38×10^9 個/mlの豊富なエクソソームが確認された。TSG6に関係するmiRNAとして既報では、miR214-5p, miR-1247-3p, miR-326-5p,

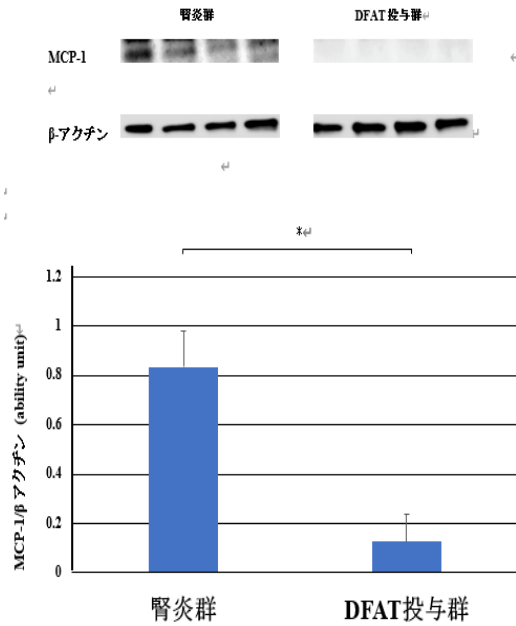


図5 移植後のMCP-1の発現

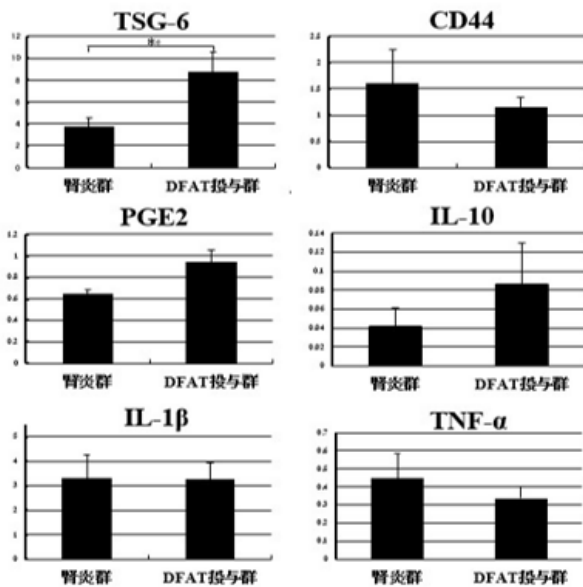


図4 移植後の各物質の発現

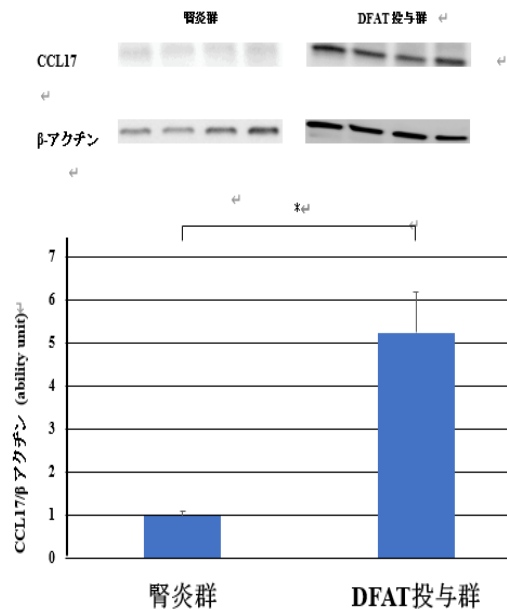


図6 移植後のCCL-17の発現

	解析 No.	Test(分子)	Control(分母)	$\Delta\Delta Ct$ (Log2 [Test/Control])	Fold Change ([Test/Control])	Reguration	
mmu-miR-23a-3p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.92	1.89	1.89	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-0.18	1.13	1.13	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.89	1.85	1.85	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.05	1.04	1.04	up
mmu-miR-30a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.65	1.57	1.57	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-1.10	2.14	2.14	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.55	1.46	1.46	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.98	1.97	1.97	up
mmu-miR-181a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	0.14	0.91	1.10	down
	G2	No5 lung	No4 lung	0.38	0.77	1.30	down
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.18	1.13	1.13	up
	G4	No6 lung	No4 lung	0.26	0.84	1.20	down

図7 移植後のエクソソーム中のmiRNAの発現

miR204-3p, miR-23b-3pなどがある^{3,4)}。今回の我々の検証でもmiR-23b-3pはDFATおよび培養上清投与の両方において腎と肺、血清共に発現亢進を認めており既報どおりの結果である。つまり、同エクソソームがDFAT細胞移植によりまたはDFATの培養上清中に産生されそれが肺、腎臓に作用して、更にはTSG-6の産生亢進、組織修復に寄与した可能性があり得る。miR214-5pは既報ではその発現が低下してそれによりTSG-6が亢進すると報告されている。我々の結果では、DFAT移植により血清や腎臓でその発現が低下していたのは既報どおりであったが、肺においては発現が亢進していた。miR-326-5pは既報ではその発現が亢進するとされている。我々の結果では腎臓ではその発現が亢進し、一方肺では低下していた。miR204-3pも既報では亢進すべきであるが、我々の結果では血清、腎臓、肺共に低下を認め、既報とは逆の結果であった。miR-1247-3pは既報では亢進すべきmiRNAであるが、我々の結果では血清では亢進し、腎臓、肺ではその発現は低下していた。既報と違う点は今後検討の余地があるがmiR-23b-3pは我々の結果は既報と同一であり、TSG6を更新させるメカニズムとしてこのmiRNAが最も寄与している可能性があり、DFATを直接細胞移植しなくても培養上清中にこのmiRNAの発現が確認できれば、培養上清の投与でも効果が得られる可能性がある。

さらに既報には無いTSG6に寄与するmiRNAとして、DFATの治療を行った個体に比して無治療の個体よりもmiR-23a-3p, miR-30a-5pが肺、腎臓共に発現が亢進しており、miR-181a-5pが低下している結果が得られた(図7)。TSG6発現亢進につながる、

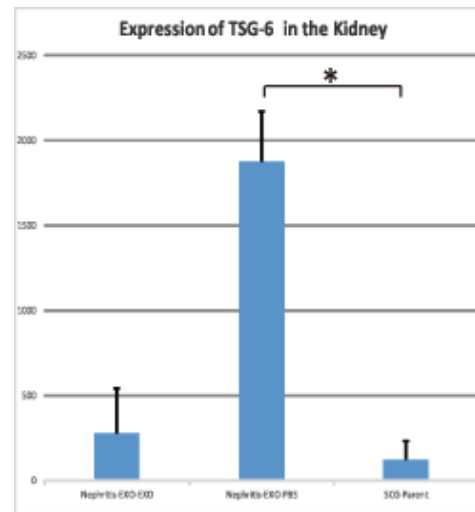


図8 エクソソーム注射後のTSG-6の発現

既報にはない新規のmiRNAの可能性のある注目すべき結果であり、今後頭数を増やして結果の蓄積を行っていく予定である。またDFATの培養上清中のエクソソームを疾患モデルに直接注射した後、腎臓でのTSG-6が疾患群より有意に上昇している現象が確認出来た(図8)。エクソソームを2回投与した場合、無治療群と同程度にこれが低下していた。TSG-6の前駆物質であるTNF α も同様の結果が得られた。

4. 考察

我々の結果ではDFAT細胞移植によりTSG-6の発現が亢進して、それが免疫抑制作用を示すことが腎障害改善のメカニズムの概略である。このTSG-6がどのような形で発現が亢進して更に免疫抑制につい

てどのような役割を担っているかはいくつかの報告があるが、まだ完全には解明できていない^{5,6)}。

また近年、間葉系幹細胞由来のエクソソーム分泌により種々の効果が得られることが報告されている^{7,8)}。

DFATの細胞治療において、当初は腎臓に直接投与を行い腎臓を改善することを想定していたため、腎動脈からDFATを直接投与することも行っていた。ある程度の効果はそれでも得られたが、ヒトにそれを行うことを考えると侵襲が大きくそこで静脈による全身投与を別に行った結果腎臓に直接投与するよりも治療成績が良好で、侵襲も腎臓に直接投与するよりもはるかに少なく、より臨床応用できる可能性が高いと考えられた。しかし投与されたDFATがほとんど肺でトラップされ腎臓に到達しないにも関わらず腎症が改善する機序の詳細が不明であり、臨床応用するためにはその探索は必要と考えて、DFATを静脈から投与することを前提に研究を継続した。過去の我々の経験では、細胞を静脈に投与した場合にDFATではその数によっては肺に塞栓が起きたためか、注射後すぐに死亡する動物モデルが観られた。間葉系幹細胞をヒトに投与して疾患を投与する場合、ヒトでも同様のことが過去にも報告されておりその安全性を担保することが臨床応用では必要である。そこで今回DFATから産生されるDFATよりはるかに微小で塞栓の可能性はほぼ皆無であるため、安全性が遥かに高いエクソソームによる治療を考えて今回の結果を得た。特定のエクソソームを今後作成する技術は現在無いが今回の我々の研究で例えばDFATの培養上清中に既報のmiR-23b-3pや今回我々が見出したmiR-23a-3p, miR-30a-5pが確認され、その培養上清中のエクソソーム注射を行えば抗炎症、免疫作用が得られて、それがTSG6の発現を亢進させて、細胞の直接投与よりも安全に治療が行える可能性が今回の研究で示唆されたものであると考える。今後エクソソームについては更なる検証の蓄積が必要である。

5. 結 語

DFATの細胞移植により腎障害を改善させて、また安全性を確認することができた。腎障害について今回は免疫を機序とする腎炎について行った。糖尿病や高血圧に起因する腎障害についても、間葉系幹

細胞の作用についての他の報告から障害を改善できる可能性がある。また細胞を直接投与しなくても細胞よりさらに微小な安全性の高いエクソソームを利用した治療に結び付けられる可能性があり、この治療法が腎障害に幅広く安全に行える可能性があることが示唆された。

(※この研究は、令和3年度日大学術研究助成金・総合研究の助成金交付により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。今回研究の機会を与えて頂きました本学のすべての関係者の方々に心より感謝致申し上げます。)

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008 ; 215 (1) : 210-22.
- 2) Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell. Res Ther* 2015; 6 : 80. 1-16.
- 3) Yang Hu, Gaigai Li, et al. Upregulated TSG-6 Expression in ADSCs Inhibits the BV2 Microglia-Mediated Inflammatory Response. *Biomed Res Int.* 2018 ; 7239181.
- 4) Takashi Miyaji, Taro Takami, et al. Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells. *J Clin Biochem Nutr.* 2020 ; 66 (3) : 213-223.
- 5) Sihyung Wang, Chanbin Lee, et al. Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein ameliorates chronic liver damage by promoting autophagy formation in mice. *Exp Mol Med.* 2017 ; 49 (9) : e380.
- 6) L Kui, G C Chan, et al. TSG-6 Downregulates IFN-Alpha and TNF-Alpha Expression by Suppressing IRF7 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Mediators Inflamm.* 2017 ; 7462945.
- 7) Donald G Phinney, Mark F Pittenger. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017 ; 35 (4) : 851-858.
- 8) Kenji Tsuji, Shinji Kitamura, et al. Secretomes from Mesenchymal Stem Cells against Acute Kidney Injury: Possible Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2018 : 8693137.