

## 研究課題名

### 「骨髄幹細胞の動員活性強化は培養人工骨の再生能を向上させるか？」

#### 1. 研究の背景と目的

造血幹細胞の臓器再生における役割は近年、急激に研究が進み徐々に明らかになりつつあるが、骨再生における役割は未だに不明瞭な点が多い。この点を明らかとするには造血細胞を可視化可能な動物個体を用いた動物実験による検証が必要である。

本実験では可視化可能な骨髄細胞を移植した骨髄キメラマウスを作成し、本マウスを用いて骨再生部位への幹細胞の動員と関与の可能性を探るとともにそのメカニズムを解明する。

#### 2. 対象患者

ヒト骨膜組織は新潟大学医歯学総合病院を受診する患者の内、同意の得られた患者のヒト骨膜組織を用いる。対象は①歯槽骨・顎骨の再生医療のためにセルプロセッシングセンターにて培養させていただいた骨膜の一部、あるいは②難抜歯の親不知の症例において本来、廃棄すべき骨片から採取した骨膜とする。症例数については5年間で50名程度を予定している。これをin vitroにて三次元培養した後に、マウスに移植する。

#### 3. 研究実施期間

平成27年7月22日～平成32年6月30日まで

#### 4. 研究の方法

##### 4. 1. 研究のデザイン

ヒト組織を用いて作成した骨膜シートをマウスに移植する研究であり、ヒトへの治療介入や遺伝子の解析は行わない。

##### 4. 2. 研究のアウトライン

###### 【ヒト研究用試料について】

ヒト骨膜組織は新潟大学医歯学総合病院を受診する患者のヒト骨膜組織を用いる。ヒト骨膜組織は番号化され、連結可能匿名化して扱い、外部に漏れないよう厳重に管理する。厚生労働省の提示した臨床研究に関する倫理指針を遵守し、本研究の趣旨を説明し、文書による同意を得て採取する。提供者のプライバシー保護、および人権擁護に十分留意することにより、本研究の解析対象とする。発表の際は個人情報とは特定出来ないように配慮する。

###### 【実験内容】

###### #1 骨髄移植モデルの作成

C57BL/6-CAG-EGFP(H-2<sup>b</sup>)をドナー、Balb/c nu/nu(H-2<sup>d</sup>)をレシピエントとして骨髄移植を施行することで骨髄細胞のみを可視化可能な骨髄キメラマウスを作成する。骨髄移植法としては6-9Gy骨髄破壊的照射を施行したマウスに $1-10 \times 10^6$  cellの骨髄単核球を尾静注により移植する(本実験では骨髄をEGFPを恒常的に発現するドナー骨髄細胞にほぼ完全に置き換える必要があり、骨髄破壊的照射が必要である)。移植後4-5週でhematopoietic reconstitutionが得られるため、末梢血の血球数及びFACSにより末梢血中のドナーキメラリズム(白血球におけるGFP陽性率)を確認し、生着不全のレシピエントは実験より除外する。

## #2 人工培養骨の骨髄キメラマウスへの移植

骨髄移植後6-7週で骨髄キメラマウスの背部皮下に、培養骨(骨膜シートを含む)を移植する。一定期間の飼育観察を経て周囲組織とともに培養骨を摘出し、パラフィン切片あるいは凍結切片を作製し、組織学的・免疫組織学的解析を行う。

## #3 G-CSF投与による末梢血造血幹細胞の動員と骨再生部位への集積

G-CSFの全身投与、あるいはゼラチンハイドロゲルなどの徐放性基材の局所投与を背部皮下へ行う。骨再生部位モデルは骨膜細胞から作製した培養人工骨の皮下移植により作製する。G-CSFにより骨髄から動員された幹細胞がこのような骨再生部位に集積する可能性を検証する。さらに、創傷治癒や組織再生において効力があるといわれる多血小板血漿(PRP)の骨再生部位への局所投与がG-CSFとの相乗効果をもたらす可能性について検討する。

### 【動物の処置】

#1 骨髄移植法:頸椎脱臼又は炭酸ガス吸入によりドナーマウスを安楽死させた上で、両上腕骨、大腿骨、脛骨より骨髄細胞の採取を行う。その後、比重遠心法により骨髄単核球を分離する。上記の処理により得られたドナー骨髄単核球を6~9 Gyの全身照射後のレシピエントマウスに尾静注より骨髄移植を行う。移植細胞数は $1-10 \times 10^6$ 個とする。

移植第5-6週に末梢血を採取し、フローサイトメトリーによりドナーキメリズムおよび血算値を確認する。生着不全のマウスに関しては頸椎脱臼又は炭酸ガス吸入によりドナーマウスを安楽死させる。

#2 G-CSFの投与方法:  $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を5-10日間、尾静脈注あるいは皮下注射する。ゼラチンハイドロゲルは市販のキット(ワコー)を使用する。ゼラチンハイドロゲルに関しては背部皮下へ移植する。

#3 PRPはレシピエントあるいはドナーと同系統のマウスより、遠心法により調製する。これにトロンビンを加えてゲル化させ局所に注入あるいは移植する。

#4 培養骨はヒト骨膜細胞をコラーゲンスポンジなどの三次元担体に播種培養して作製する。これを背部皮下に移植する。

## 5. 動物実験における倫理と法令遵守

医学部倫理委員会承認後、動物実験については、新潟大学動物実験審査委員会に計画書を提出し、承認を得る。また、使用する遺伝子改変マウスに関しては第二種使用等拡散防止措置に基づき新潟大学遺伝子実験委員会の承認を得る。

## 6. 組織提供者の人権に対する配慮

- 1) 研究実施に係るデータ類および同意書等を取扱う際は、被験者の秘密保護に十分配慮する。
- 2) 病院外に提出する資料等では、被験者識別コードを用いて行う。
- 3) 研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないこととする。
- 4) 研究の目的以外に、研究で得られた被験者のデータを使用しない。

## 7. 患者の費用負担

費用負担は生じない。

## 8. ヘルシンキ宣言への対応

本研究は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針およびヘルシンキ宣言（2013年改訂）を遵守して実施する

## 9. 記録・試料等の保存

本研究に関する実験記録、検査データはCDあるいはデータシートの紙媒体に記録保存される。倫理委員会からの承認書類、被験者の同意に関する記録は、研究責任医師が、紛失や個人情報の漏洩を来さないよう厳重に保管する。保管期間は研究終了後5年間とする。破棄する際は、個人情報が漏洩しないように破棄する。

## 10. 研究結果の公表

本研究により得られた有用なデータは、個人情報が特定されない形で、学会発表あるいは論文発表を行う。

## 11. 研究組織

### 11.1. 主任研究者 中田 光

新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センター センター長/教授  
〒951-8520 新潟県新潟市中央区旭町通一番町754番地  
TEL: 025-227-2029 FAX: 025-368-9022

### 11.2. 分担研究者

<学内>

牛木 隆志	所属	医歯学総合病院	生命科学医療センター	職名	講師
増子 正義	所属	医歯学総合病院	高密度無菌治療部	職名	准教授
吉江 弘正	所属	医歯学総合研究科	歯周診断・再建学分野	職名	教授
高木 律男	所属	医歯学総合研究科	顎顔面口腔外科学分野	職名	教授
川瀬 知之	所属	医歯学総合研究科	歯科薬理学	職名	准教授
永田 昌毅	所属	医歯学総合研究科	顎顔面口腔外科学分野	職名	准教授
奥田 一博	所属	医歯学総合研究科	歯周診断・再建学分野	職名	准教授
藤本 陽子	所属	医歯学総合病院	生命科学医療センター	職名	特任専門職員
渡辺 真理	所属	医歯学総合病院	生命科学医療センター	職名	非常勤職員
伊藤 祐子	所属	医歯学総合病院	生命科学医療センター	職名	産学連携研究員
石黒 創	所属	医歯学総合研究科	血液内分泌代謝学分野	職名	大学院生
片桐 隆幸	所属	医歯学総合研究科	血液内分泌代謝学分野	職名	大学院生

## 12. 研究資金および利益相反

本研究は、新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センターにおける研究費により行われるものであり、患者への費用負担は発生しない。

また、本研究の結果および結果の解釈に影響を及ぼすような利益相反回避の必要性は存在しない。

### 12.1. 利益相反

- 1) 研究代表者は、本研究を実施するに先立ち、本研究実施に利益相反の問題がないことについて、適切に管理する。
- 2) 研究機関は、倫理審査委員会が規定するすべての要件を遵守する。