

# 効率の良い無限分裂ヒト歯髄幹細胞の樹立に成功

## ～歯髄再生医療への貢献を目指して～

### 概要

国立大学法人岩手大学は、変異したサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) およびその結合タンパク質であるサイクリンD、テロメララーゼ酵素サブユニット (TERT) の3種遺伝子を導入することで、効率の良い無限分裂ヒト歯髄幹細胞の樹立に成功しました。これは岩手大学工学部生命コースの折本愛研究員、福田智一教授、国立がん研究センターの清野透主任分野長・部門長らと、岩手医科大学、東北大学との共同研究による成果です。

歯髄幹細胞は様々な組織に分化する能力を保持し、脱落した乳歯や智歯（親知らず）等の抜去歯から採取可能なため、入手しやすい細胞治療の細胞源として注目されています。すでに、歯髄幹細胞による歯髄再生の臨床研究は開始され、実用化は近いと考えられていますが、多大な費用と時間を要する治療方法では、現実的ではないため、より多くの患者様に提供できる歯科治療として実現させるには、患者様から採取した歯髄幹細胞を低価格に安定供給できる効率の良い方法が期待されています。今回、我々の研究グループの作出した無限分裂ヒト歯髄幹細胞は、高い増殖能力を示し、従来のがん遺伝子を使用した無限分裂法と比較して元の細胞の性質を良好に保持していることを明らかにしました。この研究成果は、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生医療の低コスト化と安全性試験の再現性向上の貢献に繋がる新しい技術です。

本研究成果は、令和2年3月4日に米国の科学雑誌「Plos one」に掲載されました。

### 【背景】

歯髄は、歯の機能維持に重要な役割をもっています。深い齲蝕（むし歯）や歯髄炎などに対して、歯髄を除去する「抜髄」が必要となる場合が多く、抜髄がなされた歯は、人工物による充填しかできません。歯髄を失った歯は、強度低下から歯の破折をひきおこす割合が上昇し、結果的に歯を喪失するリスクが増大します。このように歯の延命を図るためには、歯髄を保存することがとても重要です。近年では、自己増殖能・多分化能を有する間葉系幹細胞の移植による再生療法開発研究が盛んに行われています。なかでも歯髄幹細胞\*1は、脱落した乳歯や智歯（親知らず）等の抜去歯から採取可能なため、他の幹細胞と違い入手しやすい細胞治療の細胞源として、有望な多能性体性幹細胞です。歯髄幹細胞による歯髄再生歯髄治療法の開発研究が急速に進められ、歯髄幹細胞による歯髄再生を目的とする臨床研究もすでに行われています。しかし、実用化に向けて、治療技術が安全で効率的かつ低コストに抑えることが、課題となっています。そこで、今回我々は、K4DT法

(変異型 CDK4, サイクリン D, TERT) という無限分裂方法\*2 を用いて、効率の良い無限分裂ヒト歯髄幹細胞の作出を試み、その細胞の特性について解析を行いました。

### 【研究成果】

ヒト歯髄幹細胞に、レトロウィルスを用いて変異型 CDK4、サイクリン D、TERT の3 遺伝子を導入し作製した K4DT 細胞は、連続的な細胞継代を行った結果、細胞分裂し続け、細胞増殖が有意に加速することを見出しました (図 1)。さらに、染色体解析の結果、K4DT 細胞は正常の染色体パターンを示し (図 2)、ヒト歯髄幹細胞の幹細胞表面マーカが維持されていました (図 3)。さらに、アリザリンレッド S 染色、オステオカルシンの免疫染色、オイルレッド O 染色にて作出した K4DT 細胞は、石灰化能、骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導能が維持されていることが分かりました (図 4)。

以上の結果より、元の染色体パターンおよび分化能力を維持したまま、細胞分裂を劇的に加速できる、効率の良い無限分裂ヒト歯髄幹細胞の樹立に成功しました。本研究の成果は、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生医療の実用化に貢献する可能性が高い重要な成果です。

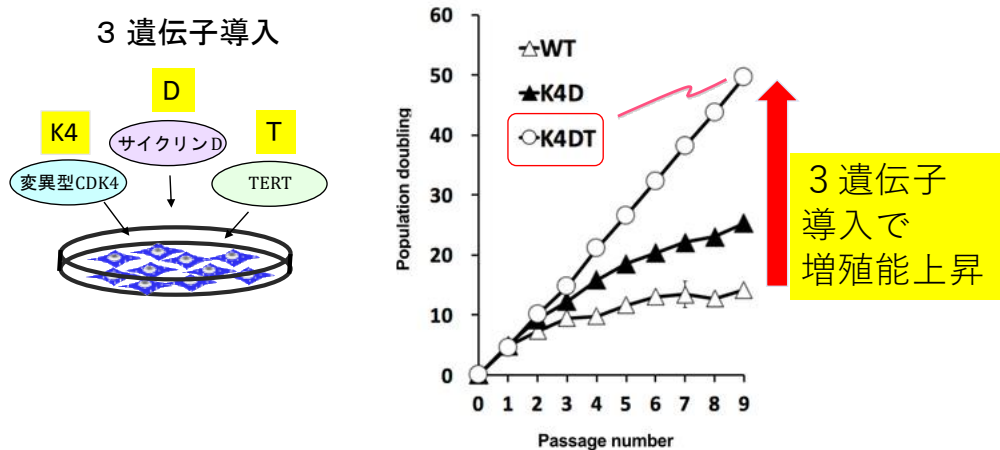
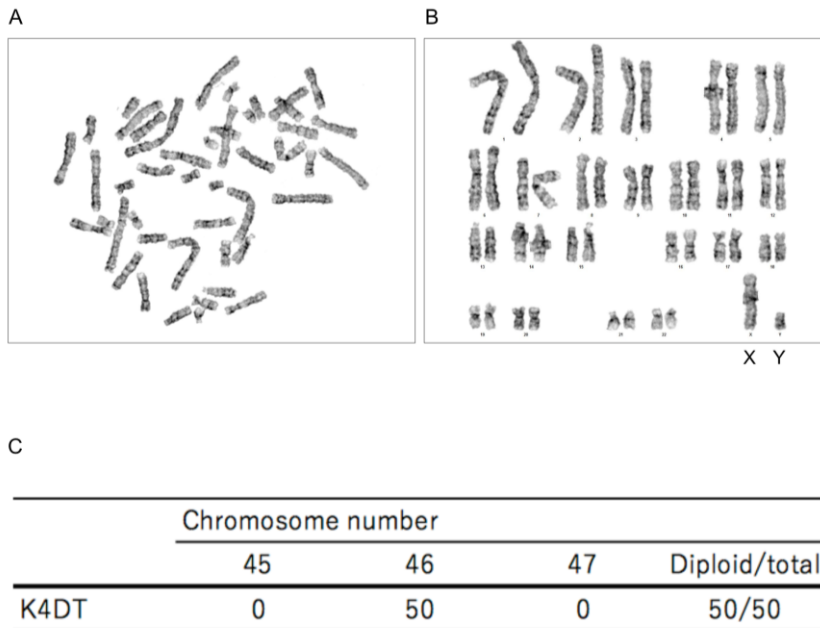
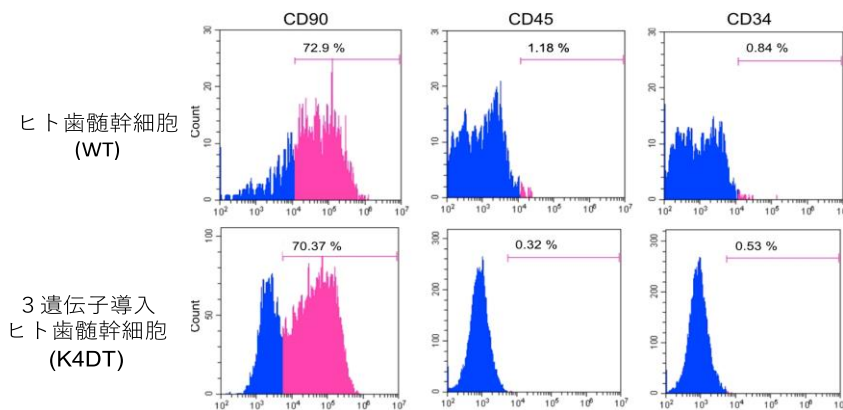


図 1 : 変異型 CDK4、サイクリン D、TERT の3 遺伝子を導入し作製した歯髄幹細胞 (K4DT) は、連続的な細胞継代を行った結果、細胞増殖が有意に加速することを見出した。



**図 2 : 3 遺伝子導入ヒト歯髄幹細胞の染色体解析**

A : 細胞分裂期の染色体。B : 染色体を並べた核型解析。C : 染色体本数分布。50 細胞における倍加率を算出したところ、2 倍体細胞は、22 対の常染色体と 1 対の性染色体、46, XY の正常の染色体本数を維持していることを示した。



**図 3 : 3 遺伝子導入ヒト歯髄幹細胞 (K4DT) の幹細胞表面マーカは維持されていることを確認した。**

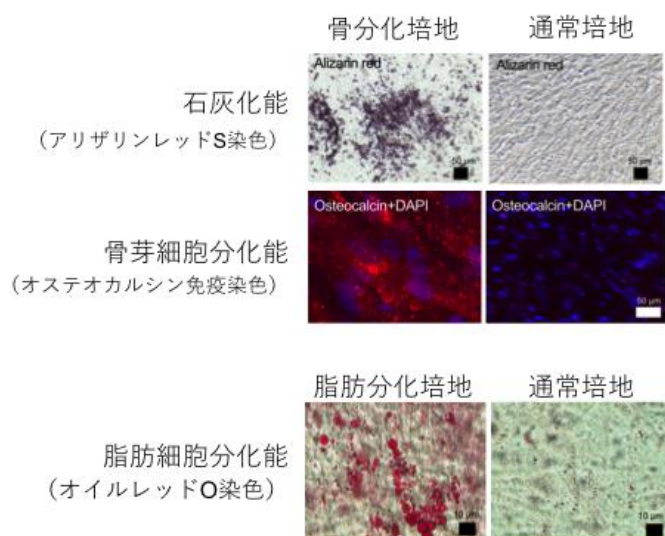


図 4 : 3 遺伝子導入ヒト歯髄幹細胞 (K4DT) の石灰化能、骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導能が維持されていることを確認した。

#### 掲載論文

題 目 : Efficient immortalization of human dental pulp stem cells with expression of cell cycle regulators with intact chromosomal condition

著 者 : Orimoto A, Kyakumoto S, Eitsuka T, Nakagawa K, Kiyono T, Fukuda T

誌 名 : PLOS ONE

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229996> (doi: 10.1371/journal.pone.0229996)

公表日 : March 2, 2020

#### 【用語解説】

- ・ \* 1 ヒト歯髄幹細胞; 歯髄の中に存在する幹細胞。この細胞は、神経細胞、骨芽細胞、脂肪細胞などの様々な細胞に分化することが可能であり、近年、再生医療への応用が期待されている。
- ・ \* 2 無限分裂方法; 初代培養細胞は、細胞老化のため、無限に細胞分裂できない。ヘイフリック限界と呼ばれている。細胞老化による分裂停止の限界を乗り越えるために、様々な無限分裂方法が従来用いられてきた。SV40 ラージ T や E6/E7 遺伝子を用いた方法が最も一般的だが、染色体の異常を誘発することが知られている。