

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890065

研究課題名（和文） 顎口腔領域の修復・再生および破壊に関わる幹細胞の性状解析と放射線生物学的検討

研究課題名（英文） Radiobiological analyses of stem cells from oral and maxillofacial tissue.

研究代表者

阿部 成宏 (ABE SHIGEHIRO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00510364

研究成果の概要（和文）：

1. 修復・再生に関わる幹細胞：[目的]われわれは、過去にヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞（Apical pulp-derived cells; APDCs）の性状解析と再生医学への応用を視野に入れた基礎的研究を行ってきた。その結果、APDCsの中に、神経堤幹細胞様細胞が存在している可能性を見出した。そこで、Neurosphere法を用いてそれらを単離し、性状解析を行った。また、根未完成歯へ放射線照射を施行すると、根形成阻害が生じることは以前から報告されていたが、それらのメカニズムを示唆するような報告が存在しないことから、それらを検討した。[結果]Sphere形成能は歯冠部歯髓由来細胞よりも、APDCsは高い形成能を保持していた。また、そのSphere形成細胞(Pulpal sphere-forming cells; PSFCs)は、神経堤細胞系統(硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞および神経細胞)へと分化することができる細胞集団であることを見出した。さらに、APDCsとPSFCsを用いて、放射線生物学的に検討した結果、若年者の歯根形成期にある歯が放射線照射を受けると、根尖部歯髓幹細胞様細胞は、むしろ放射線抵抗性を示し、細胞死によって硬組織形成細胞の供給が不能になるのではなく、機能細胞への分化が抑制される結果、歯根形成不全に至る可能性が示唆された。

2. 破壊に関わる幹細胞：[目的]近年、悪性腫瘍においても、同様に癌幹細胞（cancer stem cell; 以下 CSCs）と呼ばれる細胞集団の同定と性状解析が多くの研究者から報告されている。今回われわれは、ヒト口腔癌細胞株（HSC シリーズ）を用いて、無血清培地にて sphere を形成する CSCs 様の細胞集団を分離し、その性状解析と放射線感受性に関する検討を行った。[材料および方法]ヒト舌癌細胞株 HSC シリーズ（HSC-3, 4, 6 および 7）を用いた。各種細胞株における CD133 と CD44 の FACS 解析を行った。さらに舌癌患者より採取した癌組織を用いて CD133 および CD44 にて免疫染色を行った。次に無血清培地での sphere 形成能を評価し、sphere 形成が良好に認められた HSC-3 および HSC-7 の 2 細胞株に関して、詳細に性状解析を行った。分化能に関しては、20%FBS 添加 DMEMHG にて 2 週間培養し、成熟角質マーカーを RT-PCR、免疫染色にて評価した。放射線感受性に関しては、コロニーアッセイを用いた。[結果]多くの CSCs マーカーである CD133 の発現は認められず、CD133-/CD44+細胞でも sphere 形成が認められた。同様に、舌癌組織の免疫染色においても CD133 の発現は認められず、CD44 は分化領域を除く領域に陽性細胞が認められた。Sphere 形成能のある細胞は未分化能と自己複製能を保持しており、血清添加培地での分化誘導に対して、成熟角質マーカーの発現が認められた。sphere 形成細胞と Bulk での放射線感受性に対してコロニーアッセイを行ったが、HSC-3 では bulk に比較して放射線感受性、HSC-7 では有意差を認めないまでも、若干の放射線抵抗性を示した。またこれらの結果は DNA の 2 本鎖切断の修復能を反映していた。[結論] 口腔癌幹細胞マーカーとして報告された CD133 や CD44 に関しては、われわれの結果では、分化マーカーを発現していない Sphere 形成細胞であっても CD133 の発現を認めなかった。癌幹細胞特異的のマーカーに関する研究は、今後より詳細な検討が必要である。今回、われわれは、ヒト口腔癌細胞株中に存在する未分化細胞集団を分離し、分化能ならびに放射線生物学的に検討を行い、必ずしも放射線抵抗性を示さない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

1. Radioresponse of Human Apical Pulp-Derived Cells (APDCs): An Implication for Root Hypoplasia of Developing Teeth following Radiotherapy

Purpose: When pediatric patients receive radiotherapy for the head and neck regions, root hypoplasia of developing teeth often occurs. The purpose of this study was to pursue the possible biological mechanisms underlying root hypoplasia following irradiation.

Methods and Materials: Apical pulp-derived cells (APDCs) were isolated from freshly extracted human third molars with immature apices. Multipotent pulpal spheres, which are thought to contain an enriched population of stem/progenitor cells, were formed from the APDCs, using a neurosphere culture technique. After γ -irradiation, pulpal sphere-forming cells (PSFCs) and bulk APDCs were subjected to radiosensitivity and hard tissue-forming assays.

Results: Compared to bulk APDCs, the PSFCs exhibited a radioresistant phenotype and a higher capacity for DNA double strand break repair. Irradiation induced a significant increase in a senescence-like phenotype in both cell types. Neither type of cells exhibited a significant induction of apoptotic changes, even after 8 Gy irradiation. Ability to form hard tissue *in vivo* was significantly decreased only in PSFCs following 4 Gy irradiation.

Conclusions: We conclude that induction of the inhibition of the differentiation process of stem/progenitor cells into mineralized cells could contribute to the root hypoplasia of developing teeth after radiotherapy.

2. Sphere-forming capacity does not relate tumorigenicity or radioresistance in Established Human Oral Cancer Cell lines.

Purpose: Like many normal tissues, solid cancer may be maintained by a rare population of cancer stem cells (CSCs). The objective of this study was to identify and characterize a subpopulation of sphere-forming cancer cells (SFCCs) from human oral cancer cell lines.

Methods and materials: Established human oral squamous cell carcinoma (SCC) cell lines were cultured and subjected to nonadherent spheres. We subjected to tumorigenicity, cell surface markers, differentiation capacity and radioresponse analyses.

Results: CD133 was not expressed both of bulk and SFCCs, and CD44 was expressed all of cell lines. Same results were shown in human oral SCC tumor samples. High degree of tumorigenic HSC-3 and low degree of tumorigenic HSC-7 formed many typical cancer spheres. SFCCs were undifferentiated, and differentiated into mature keratino-cancer cells under appropriate condition. The tumorigenic capacity difference is not recognized in both cell lines. Although HSC-7 SFCCs were not change radioresistant capability, but the HSC-3 were a radiosensitivity compared to bulk cells. Furthermore, the DNA double strand breaks repair capacity enhances the radioresponse of SFCCs.

Conclusions: Taken together, our findings lead to the thought that the candidate markers

were not suitable for oral CSCs and all of the SFCCs did not contribute to tumorigenicity and radioresistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

体内の多くの組織には、自己複製と多分化能を保持している幹細胞とよばれる未熟な細胞集団が存在している。顎口腔領域にも、多くの組織幹細胞 (Tissue specific stem cells) が存在し、組織の発生のみならず修復・再生を絶えず繰り返していることがわかっている。また、その逆に組織を破壊せしめ、固体の死をもたらす悪性腫瘍においても、同様に癌幹細胞 (cancer stem cell) と呼ばれる細胞集団が近年同定され、多くの研究者から報告されており、現在までに、白血病、肺癌、乳癌、脳腫瘍、大腸癌、頭頸部癌などが知られている。

これらの組織幹細胞および癌幹細胞は両者とも将来の治療への応用もしくはターゲットとなることは明らかである。

しかしながら、両者ともその存在の同定および性状解析等に関しては、曖昧なところが多く、ことに顎口腔領域での幹細胞生物学は血球系などに比較して、まだ、未知な点が多い。まして、薬剤耐性能、放射線治療後の変化や、DNA 損傷/修復に関する報告は数少ない。そこで、今まで行ってきた幹細胞生物学的研究手法・方法論に基づき、本研究を遂行していく。

2. 研究の目的

(1). 放射線による歯根形成阻害メカニズム—ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞より単離した幹細胞様細胞の放射線生物学的検討—

口腔顎顔面領域に発生する悪性腫瘍に対する放射線治療は、現在、欠かすことのできない治療法の1つとなっている。その際に副作用として起こる障害は、成人においては口腔粘膜炎、唾液分泌障害や放射線性骨髄炎である。とりわけ顎骨骨髄炎が出現した場合、QOL の著しい低下を引き起こす。しかしながら、同じ顎骨中に存在する根完成後の歯には、通常臨床的障害は認められない。多数歯う蝕が発生する場合があるが、これは味覚障害や唾液分泌障害によって、う蝕になりやすい環境へと変化することで生じることが明らかになっている。一方、小児の顎顔面領域に発生した悪性腫瘍に対して放射線治療を行った際には、歯根形成阻害や歯の欠如を招くことが知られている。それらに関して詳細に検討した研究は今までに報告されておらず、多くが臨床病理学的に検討したものである。

われわれは、以前から研究に用いているヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞(APDCs)を用いることで、放射線による歯根形成阻害メカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。そこで、APDCsよりNeurosphere法により単離したPSFCsとBulkのAPDCsの2つの細胞集団を比較検討した。

(2). ヒト口腔癌細胞株からの癌幹細胞の分離同定・性状解析と放射線生物学的検討

ヒト口腔癌治療には外科療法、放射線治療ならびに化学療法があり、最近の進歩によって、治療成績ならびにQOLの向上へとつながっているが、それでも再発・転移を生じるケースも少なくない。近年、癌幹細胞が癌の再発、転移ならびに化学療法・放射線治療の予後に深く関わっている可能性が高いことが報告されている。そこで、免疫不全動物に移植した際に腫瘍形成能がある細胞株には少なからず幹細胞が存在することが予想できるためそのような口腔癌細胞株を用いて、放射線および薬剤感受性に関する検討を行った。

3. 研究の方法

(1). 放射線による歯根形成阻害メカニズム—ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞より単離した幹細胞様細胞の放射線生物学的検討—

東京医科歯科大学歯学部付属病院、倫理委員会承認の下、インフォームド・コンセントが得られた患者より、採取された根未完成歯を用いて、由来細胞を採取した[S. Abe et al. Oral Sci Int, 2007]。本実験では、幹細胞をより純化させるために、Neurosphere法に基づき、EGFおよびb-FGFを添加した無血清培地下で浮遊培養させることで単離した。また、幹細胞学的性状解析には自己複製能と幹細胞マーカーさらに、硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞および神経細胞への分化誘導実験により評価した。これらの結果より Sphere 形成細胞が多分化能を保持している細胞集団であることを見出した。この Sphere 形成細胞と Bulk にて以下の実験を行い、放射線生物学的に検討した。

- ① 放射線感受性…コロニーアッセイ
- ② DNA 損傷・修復… γ H2AXを用いた蛍光免疫染色と核内 foci 数の定量
- ③ アポトーシスの検討…TUNELの蛍光免疫染色およびFACS解析
- ④ 老化細胞の検討…SA β gal染色とその定量
- ⑤ In vitro 下での硬組織形成細胞への分化誘導
- ⑥ In vivo での硬組織再生能の検討… Scaffold へ播種した細胞を分化誘導し、ヌードマウス皮下組織へ移植した。12週後、摘出した組織の連続切片を作成して再生硬組織量を定量した。

(2). ヒト口腔癌細胞株からの癌幹細胞の分離同定・性状解析と放射線生物学的検討

細胞実験にはヒト口腔癌細胞株 HSC シリーズ (HSC-3~7) を用いた。

- ① 各種細胞株の単層培養した細胞に関して、多くの CSCs マーカーとして知られている CD133 と頭頸部 CSCs マー

カーとして報告された CD44 の FACS 解析ならびにソーティングを行った。次に CSCs の特徴として EGF、b-FGF 添加の無血清培地下での sphere 形成能を評価し、sphere 形成が認められた 2 細胞株に関して、(1) sphere 形成能 (2)selfrenewal capacity および (3)growth factor の影響に関して定量した。また、臨床的に採取したサンプル(ヒト口腔癌組織)より、凍結切片を作製し、抗 CD44 抗体にて免疫染色を行った。

② sphere 形成細胞の性状解析: sphere より凍結切片を作製し、CD133, CD44, α 6-integrin, β 1-integrin, CD71, p63, ABCG2, Hif-1 α に関して蛍光免疫染色を行った。

③ 分化能に関しては、neurosphere 法の分化誘導実験同様に、sphere を付着系培養皿へ播種し、20%FBS 添加 DMEM-HG にて 2 週間培養し、分化マーカーである CK13 および TG1 の RT-PCR、免疫染色にて評価した。

④ 放射線感受性に関しては、コロニーアッセイを用いた。

⑤ DNA 損傷・修復… γ H2AX を用いた蛍光免疫染色と核内 foci 数の定量

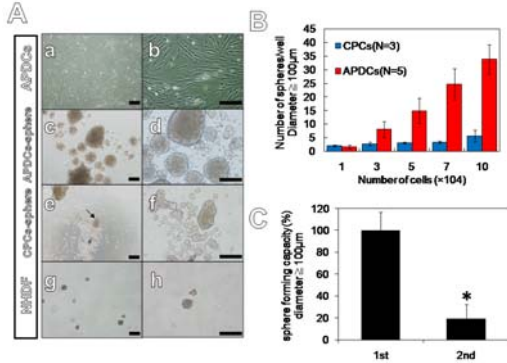
4. 研究成果

(1). 放射線による歯根形成阻害メカニズム—ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞より単離した幹細胞様細胞の放射線生物学的検討—

①PSFCs の幹細胞生物学的検討

我々は APDCs は歯冠部歯髓由来細胞よりも Sphere 形成能が高いことを見出した(図1)。その Sphere は継代することで、自己複製能を in vitro で評価できることから、それを試みた。Sphere は継代することで再度 Sphere を形成することより、自己複製能を保持した細胞集団であることが明らかになった。しかしながら、継代した Sphere の形成率は著しく低く、約 20%程度にまで低下することから自己複製能はあるが、その能力は非常に低いことが示唆された。このような自己複製能の低下は上記で報告された神経堤幹細胞でも認められている。次に PSFCs の幹細胞マーカーの検討を行った。蛍光免疫染色の結果、神経堤幹細胞マーカーとして報告されている NGFR-p75、神経幹細胞マーカーである Nestin や Musashi-1 の発現を認め、さらに RT-PCR にて、先の Nestin、Musashi-1 および NGFR-p75 のほかに神経堤細胞マーカーである Slug および Snail の発現を認めた(図2)。このことから、PSFCs には、神経幹細胞または神経堤幹細胞様細胞の存在が示唆されたため、分化誘導実験を行った。PSFCs を付着系培養後に分化誘導を行うことで、硬組織形成細胞、

脂肪細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞および神経細胞系統といった神経堤細胞系統へと分化させることに成功した (図 3-5)。したがって、PSFCs は神経堤由来幹細胞が存在している可能性が極めて高いことが示唆され、再生医療における新たな細胞供給源として期待されるものである。図1. 歯冠部(CPCs)および根尖部歯髓(APDC



s) 由来細胞の Sphere 形成能と APDCs より単離した Sphere 形成細胞の自己複製能。

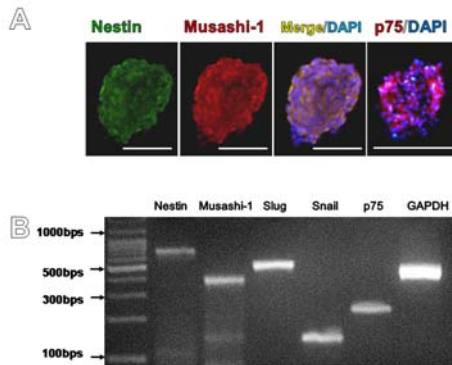


図2. PSFCs の性状解析: (A) PSFCs の形態学的所見 (B) PSFCs の幹細胞マーカー (Nestin, Musashi-1, p75, Slug および Snail) の発現
図3. PSFCs の硬組織形成細胞への分化誘導

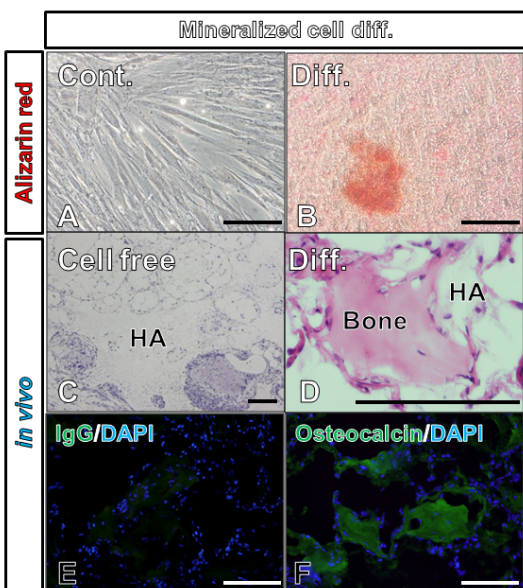


図4. 他の間葉系細胞への分化誘導

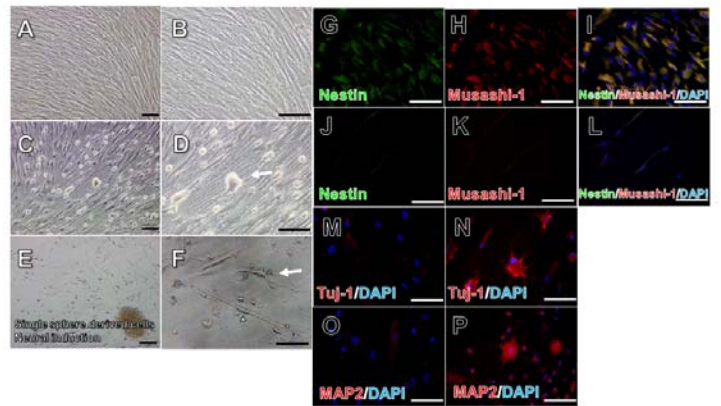
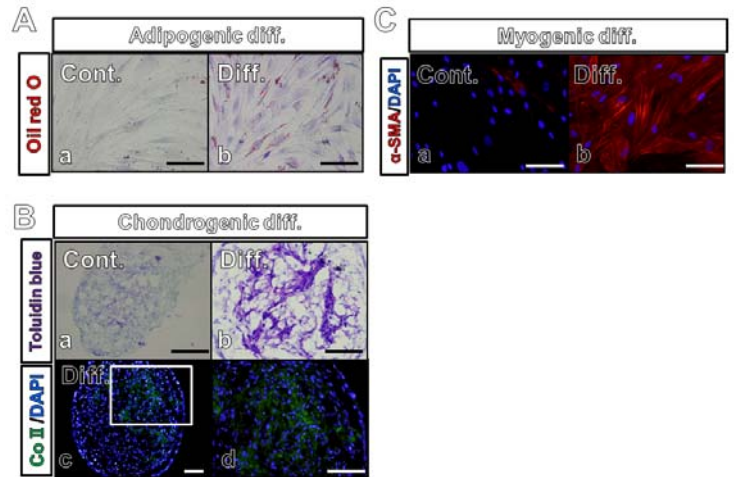


図5. 神経細胞系統への分化誘導. A, B: コントロール, C, D: 分化誘導群. 神経細胞形態を呈している. E, F: シングル Sphere から神経細胞形態への変化. G-I, M, O: コントロール, J-L, N, P: 分化誘導群. コントロールでは神経幹細胞マーカーである Nestin, Musashi-1 の発現を認めるが、分化マーカーである Tuj-1 や MAP-2 の発現は認めない。一方で、分化誘導群では、幹細胞マーカーは発現せず分化マーカーの発現を認める。

②放射線照射後の APDCs および PSFCs の挙動

放射線などによって引き起こされる DNA 損傷によって幹細胞が枯渇化することが知られ、アポトーシス、細胞老化および分化異常の 3 つのステップがその主な原因となりうることが報告されている。(図6)。分化過程での異常について Puriらは DNA 損傷によって筋肉の幹細胞であるサテライト細胞、C2C12 筋芽細胞が分化抑制されることを報告している。また、Schönmeierらは放射線照射後に骨芽細胞へと分化誘導した間葉系幹細胞においてアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の低下と硬組織形成細胞後期のマーカーであるオステオカルシンの発現低下を報告している。一方で、Nishimura らは、臨床的にはほとんど認められないが、マウスに放射

線照射することで白髪になることを報告した。同グループのInomataらは、放射線によってメラノサイト幹細胞は、アポトーシスや細胞老化を示さないが、幹細胞はニッチ内で分化することで幹細胞の供給量が減少し、枯渇化することを報告した。放射線照射による幹細胞の挙動において、分化抑制と分化促進という全く逆方向のプロセスが、結果的に幹細胞の枯渇化という同じ方向に寄与することは非常に興味深い。

そこでまず、放射線感受性を調べるためにコロニーアッセイを行ったところ、癌幹細胞同様、PSFCs は APDCs と比較して放射線抵抗性を示した(図7)。次に DNA の 2 本鎖切断 (DSB) に関して、その高感度検出指標とされるリン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX) に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。その結果、8 Gy 照射 30 分後では、核内に多数の Foci を認めるも、24 時間後にはその数は著明に減少していることから、両細胞において DSB 修復能が確認された。その数を定量し、24 時間後の Foci の数をヒストグラム化したところ、PSFCs では相対的に APDCs よりも左側にシフトしていた。すなわち DSB 修復能は APDCs よりも高いことが示唆され、この結果はコロニーアッセイの結果を非常によく反映していた (図8)。

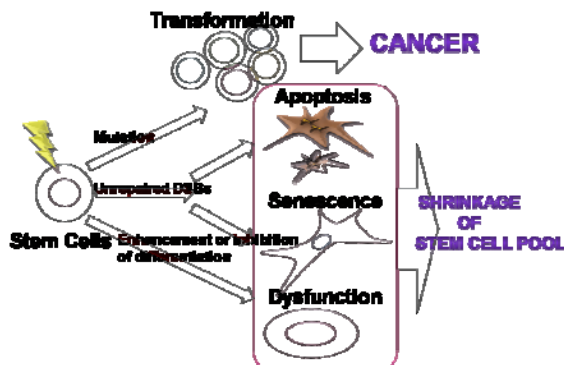


図6. 幹細胞の DNA 損傷後の挙動

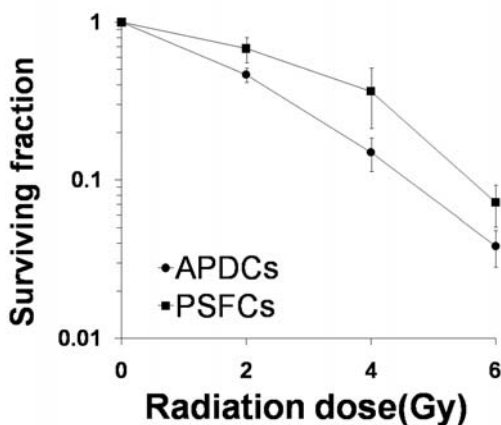


図7. APDCs と PSFCs の放射線感受性

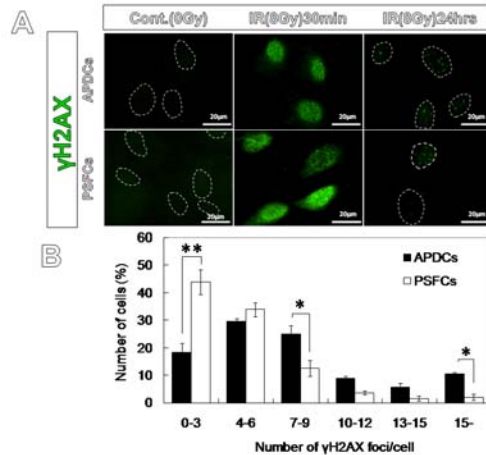


図8. 放射線照射後の DNA の 2 本鎖切断修復能. A: γ H2AX の蛍光免疫染色像. B: 8Gy 照射後、24 時間後の核内の γ H2AX の数をヒストグラム化したもの

次に、アポトーシスが検出されるかどうかを調べるために、APDCs と PSFCs に 8 Gy 照射し、24 時間後、DAPI を用いて核染色したところ、APDCs も PSFCs いずれにおいても、アポトーシス小体は認められなかった(図9)。次に、細胞老化による枯渇化の可能性について、4 Gy の放射線照射後 3 日目の細胞を用いて老化の指標とされる SA- β -gal 染色にて検討した。APDCs も PSFCs ともに大型で平坦な SA- β -gal 陽性細胞の増加を認めた。このように、細胞老化による幹細胞の枯渇化の可能性が示唆されたものの、PSFCs の陽性細胞数は、APDCs に比較して有意に少ないことから、放射線誘導性の細胞老化が幹細胞枯渇化において主要因とはなり得ないと考えられた(図10)。

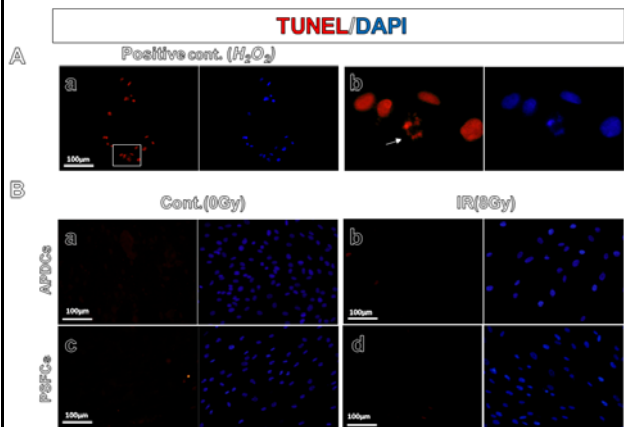


図9. 放射線照射後のアポトーシス. A: H_2O_2 にてアポトーシスを誘導した陽性コントロール. アポトーシス小体を認める(矢印). B: 実験群. APDCs、PSFCs ともに TUNEL 陽性細胞もアポトーシス小体も認められない。

そこで、分化過程に問題が生じるのかどうかを検討した。一般的に間葉系幹細胞や DPSCs な

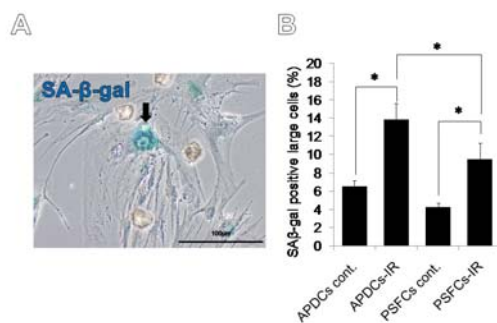


図10. 放射線照射後の老化様形態への変化とβ-gal染色. A:典型的な老化様形態. B:4Gy照射後に出現したβ-gal陽性の老化様形態細胞の割合.

どは、デキサメタゾン、β-グリセリン酸、ビタミンCを培地に添加することで、硬組織形成細胞への分化は容易に起こるが、この手法はすでに確立されたものとして知られている。また、硬組織形成細胞は高いアルカリフォスファターゼ(ALP)活性と最終分化した細胞が石灰化Noduleを形成することが知られている。APDCsとPSFCsに放射線照射を行っても、上述した手法を用いた分化誘導によってALP活性の上昇を認めたことより分化能を保持していることが示唆された。しかし、放射線照射した細胞は非照射群に比べ、ALP活性も低く、石灰化Noduleの形成量も低い傾向にあったが、in vitroでのデータからは有意差を認めなかった(図11)。そこで、ハイドロキシアパタイト(HA)スキャホールドに細胞を播種し、分化誘導したものを免疫不全マウスの皮下組織へ移植し組織工学的手法を用いてin vivo硬組織再生能も検討した。今回の実験で用いたHAは、骨再生の足場としては代表的なものであり、その手法は既に確立している。in vitroで培養したHA/APDCs、HA/PSFCs複合体に放射線を照射したのちに分化誘導したものを免疫不全マウスに移植した結果、PSFCsでは非照射群に比較し、再生される硬組織量は有意に抑制されることを見出した(図12)。

また、先臨床病理学的検討で、根形成が停止する代わりに骨象牙質(Osteodentn)が形成されるとの報告があるが、これはAPDCsが放射線照射後もある程度の硬組織形成能を保持していることと関連があることが示唆される。放射線照射によって何らかのシグナルが残存歯髄に加わることによって、このような現象を招く可能性が示唆される。

③ 結語

本研究において、APDCsとPSFCsを用いて、放射線生物学的に検討した結果、若年者の歯根形成期にある歯が放射線照射を受けると、根尖部歯髄幹細胞様細胞は、むしろ放射線抵抗性を示し、細胞死によって硬組織形成細胞の供給が不能になるのではなく、機能

細胞への分化が抑制される結果、歯根形成不全に至る可能性が示唆された。今後はin vivoモデルでこれらの現象が本当に生じているのかどうかを検証する必要があると思われる(図13)。

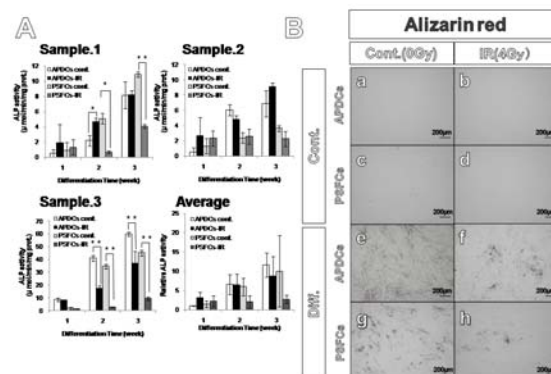


図11. In vitroでの硬組織形成細胞への分化に対する放射線の影響. A:各サンプルでのALP活性の定量分析. B:Alizarin redによる石灰化Nodule形成の染色

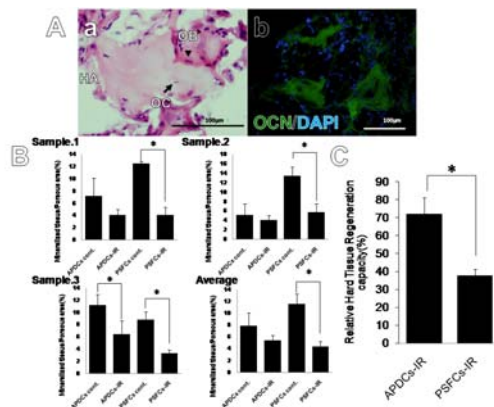


図14. In vivoでの硬組織再生能力に対する放射線の影響. A:再生硬組織の組織学的検討. a:HE染色. HA; Hydroxyapatite, OB; osteoblasts, OC; osteocyte. b:OCNの蛍光免疫染色. B:各サンプルでの硬組織再生量の定量. C:放射線照射後の相対的硬組織再生量.

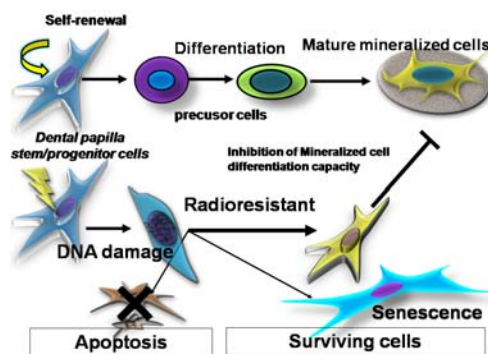


図15. ヒト根未完成歯根尖部歯髄中に存在するDPPCsの放射線照射後の挙動

現在、以上の結果は投稿中である。

(2). ヒト口腔癌細胞株からの癌幹細胞の分離同定・性状解析と放射線生物学的検討

①口腔癌細胞株および口腔癌サンプルでの CD133 および CD44 の発現

多くの CSCs マーカーである CD133 の発現は認められないか非常に低かった。また、CD44 は以前の報告から、頭頸部癌の CSCs マーカーとしての可能性が示唆されるものの、ほとんどの細胞株で陽性であり、その割合も多かった。CD133 および CD44 を用いて患者から得られた口腔癌組織を用いて免疫染色を行った場合、CD133 に関してはすべてのサンプルで腫瘍実質での陽性反応は認められなかった。また CD44 に関しては、癌真珠のような分化領域を除いた部位に様に陽性細胞が存在していた。このことから、CD133 は造腫瘍性の細胞株においても発現せず、また、実際の臨床サンプルにおいてもその発現を認めないことから、口腔癌 CSCs のマーカーとしては適切ではないことが示唆された。一方で、CD44 に関しては、その発現量が高く、これのみで CSCs マーカーとするには問題があることが示唆された(図 16)

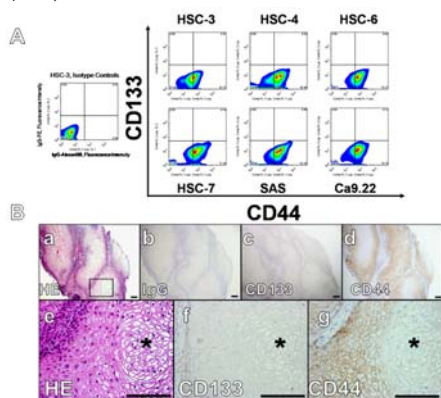


図 16. 口腔癌細胞株およびヒト口腔扁平上皮癌サンプルにおける CD133 および CD44 の発現。

Sphere 形成能のある細胞は未分化能と自己複製能を保持しており、EGF 添加の際に sphere 形成が促進された。

(2) sphere の凍結切片を用いた評価では、中心部の壊死などは認められず、未分化マーカーやインテグリンその他に対し陽性を示す細胞からなるものであった。

(3) sphere から血清添加培地下での分化誘導に対して、分化マーカーである CK13、TG1

のタンパクレベルでの発現亢進が認められ、sphere が未分化状態で適切な環境下で成熟角質細胞へと分化することがわかった。(4) sphere 形成細胞と Bulk での放射線感受性に対してコロニーアッセイを行ったが、sphere 形成細胞は bulk に比較して若干の放射線抵抗性を示した。(本学会では、より詳細に検討した結果を報告する予定である)

考察・結論： 今まで報告された癌幹細胞マーカーに関しては、幹細胞特異的なものではないように思われる。特に CD44 に関しては、過去の報告による分離では、間質細胞やその他の細胞を含んだ細胞集団から、それらを排除したに過ぎない可能性がある。癌幹細胞特異的なマーカーに関する研究は、今後より詳細な検討が必要である。

今回、われわれは、ヒト口腔癌細胞株中に存在する未分化細胞集団を分離し、分化能ならびに放射線生物学的に検討を行い、将来の癌治療における標的細胞になりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) 【総説論文】

阿部成宏、山口聡、濱田啓一、天笠光雄、三浦雅彦、放射線による歯根形成阻害メカニズム—ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞より単離した幹細胞様細胞の放射線生物学的検討—、放射線生物研究、2009 (in press) .

(2) 【原著論文】

K. Hamada, S. Yamaguchi, S. Abe, S. Ichinose, T. Abe, Y. Yamashita, T. Amagasa. In vivo bone formation by human dental pulp cells cultured without cell sorting and osteogenic differentiation induction. J. Oral Tissue Eng, 7, 15-25, 2009.

(3) 【総説論文】

阿部成宏、三浦雅彦、(総説) 癌幹細胞に関する最近の知見とその概念に基づいた癌治療戦略、日本放射線腫瘍学会雑誌、21、1-11、2009.

[学会発表] (計 5 件)

1. 阿部成宏、ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞 (APDCs) より単離した歯髓幹細胞様細胞の放射線感受性、DNA 損傷/修復および分化能に関する検討、第 53 回日本口腔外科学会総会 2008、徳島

2. **阿部成宏**、口腔癌細胞株からの癌幹細胞様細胞の分離・同定および放射線生物学的特性について、第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、2008、高知

3. **阿部成宏**、ヒト舌癌由来細胞株より単離した癌幹細胞様未分化細胞集団の性状解析、第 63 回日本口腔科学会総会、2009、浜松

4. **阿部成宏**、口腔癌細胞株からの癌幹細胞様細胞の分離・同定および放射線生物学的特性について、第 11 回癌治療増感研究シンポジウム、2009、奈良

5. **阿部成宏**、放射線による歯根形成阻害メカニズム—ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞より単離した幹細胞様細胞の放射線生物学的検討—、第 48 回日本医学放射線学会生物部会学術大会、2009、富山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 成宏 (ABE SHIGEHRO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：00510364

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし