

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293422

研究課題名(和文) DNA損傷の形態学的品質評価法を用いた歯髄幹細胞の最適培養法の開発

研究課題名(英文) Development of Optimal Cell Culture Method with Morphological Quality Assessment by DNA Damage

研究代表者

中島 美砂子 (NAKASHIMA, Misako)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・部長

研究者番号：20207773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯髄幹細胞の最適な培養法と品質管理・保証法を開発することを目的とした。まず品質管理・保証法として、SCPFGGEを用いた幹細胞のゲノムDNA損傷の形態学的評価法の開発を試みた。しかしながら酵素や物理的方法にて細胞剥離を行うと非特異的なDNA損傷が生じた。次に歯髄幹細胞の最適な培養法に関して、tri-gas incubatorを用いて安定低酸素環境で細胞培養した。その結果、増殖促進、幹細胞性、trophic効果等より5%O₂が最適であることが判明した。また、微小重力環境での細胞培養の最適条件を検討したが、通常重力を比較して、増殖、細胞安定性および品質にさほど顕著な差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed at development of the optimal culture method and quality control and assurance method for dental pulp stem cells (DPSCs). At first, the morphological quality assessment of genomic DNA damage was performed by Single-Cell Pulsed-Field Gel Electrophoresis (SCPFGGE) as a quality control and assurance method. The enzymatic or physical detachment to get a single cell suspension, however, caused a nonspecific DNA damage. Next, the optimal hypoxic condition for DPSCs was investigated in a tri-gas incubator for stable culture. The proliferation rate, stem cell properties and trophic effect were the highest in 5% O₂ culture. Furthermore, three-dimensional microgravity device were used. There was, however, little difference in the proliferation rate, cell stability and quality in microgravity compared with normal gravity in only one passage of culture. Further three passages of culture under microgravity resulted in little difference in these from normal gravity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯髄幹細胞 マルチガスインキュベータ 微小重力培養 品質検査 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾病に起因した組織や器官の傷害や機能不全に対して、間葉系幹細胞を用いた再生医療の臨床研究・治験が国内および海外にて行われている。私どもは、自家の歯髄幹細胞を抜髄後の根管内に移植し、歯髄・象牙質を再生させる治療法の新臨床研究での安全性・有効性を確認し、臨床研究を世界初ですでに開始している。一方、移植前に歯髄幹細胞の品質を評価する方法として、現状では、安全性試験として感染の有無および免疫不全マウスへの移植によるガン化の有無および、品質評価としてフローサイトメトリーによる幹細胞表面マーカー発現率および生存率測定などを行っている。しかしながら、幹細胞は個体差があり、培養環境や血清の影響も強く受けるため、品質のばらつきが大きい。また、幹細胞の品質を保証し一定の組織再生をもたらす品質評価法は未だ確立しておらず、対象疾患による違いも考慮する必要がある。したがって、歯髄幹細胞の自家移植さらには同種移植による歯髄・象牙質再生治療を目的として、安全性・有効性を確実に担保するためには、歯髄幹細胞の規格化を行い、同等性・同質性を決定する方法を確立する必要がある。

一方、体外で操作したものを体内に戻す点で再生医療と類似した不妊治療において、DNA が損傷した精子を用いると染色体異常・先天異常率が増加する可能性が指摘され、精子の品質評価法として、DNA 損傷の定量的評価並びに損傷精子の排除の必要性が提唱されている。形態学的評価によるDNA 損傷精子の排除法として、研究分担者の兼子らは Single-Cell Pulsed-Field Gel Electrophoresis (SCPFGE)を開発し、不妊治療における精子の品質評価法として確立しつつある。幹細胞においてもテロメア長の短縮、酸化ストレス、その他によりDNA 損傷が蓄積されると、H2AX のリン酸化、p16、p53 発現の上昇等が生じ、細胞老化が進行し、細胞の形質が劣化することが知られている。よって、幹細胞においてもDNA 損傷の検出は重要で、品質評価法として有用であると考えられる。したがって、本研究では、現在、精子で確立している SCPFGE を歯髄幹細胞におけるDNA 損傷の形態学的評価による品質評価に応用する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、歯髄・象牙質再生治療法を確実に成功に導くため、歯髄幹細胞の最適な培養法と品質管理・保証法を確定することを目的とする。すなわちまず新規に、幹細胞のゲノムDNA 損傷の形態学的評価法を確立する。ついで、ガス分圧が自由に換えられ安定した培養環境が得られる自動培養装置を用いて、長期継代培養しても形質が安定し、DNA 損傷の蓄積が最小限に抑えられ細胞老化を防げる最

適な酸素分圧を決定する。さらに、三次元微小重力培養装置を用いて、微小重力環境での最適培養条件を検討する。

3. 研究の方法

(1) Single-Cell Pulsed-Field Gel Electrophoresis (SCPFGE)を用いた幹細胞のゲノム DNA 損傷の形態学的評価法の開発

1) 非特異的DNA 損傷が見られないシングルセルへの剥離・解離法の検討

市販のトリプシンEDTAにはDNaseが含まれている。よって、本実験において、トリプシンEDTAをdishから歯髄幹細胞を剥離し、シングルセルへ解離するために使用すると、非特異的に細胞のDNAが傷害されてしまい、正確にDNA損傷を観察することができない。そこで、ヒト歯髄幹細胞をシングルセルに解離でき、かつ剥離時の非特異的DNA損傷が見られない最適な方法を検討した。ポジティブコントロールとして、未分取歯髄幹細胞を長期継代培養し、senescenceに達した細胞を用いた。ネガティブコントロールとして、ヒト膜分取歯髄幹細胞の3代目を用いた。

(i) 各種条件にて細胞を剥離：

a. EDTA、b. EDTA 処理後、スクレイパーで剥離、c. TrypLE™ Select、d. Accutase、e. スクレイパーのみで剥離 a~eの方法にて細胞を剥離した。

(ii) サイトスピン標本を作製：サイトスピン標本に、DTT、界面活性剤、トリプシン(アフィニティー精製し、DNaseを除去済み)を含むアガロースを載せ、固めた。

(iii) SCPFGEによってDNA損傷の程度を検討：37℃恒温槽中で、細胞を融解、電気泳動(SCPFGE)後、DNAを蛍光染色し、蛍光顕微鏡(KEYENCE)にて観察した。

これにより、最適な細胞剥離・解離条件の検討を行った。

(2) 低酸素分圧による歯髄幹細胞の最適な培養法の開発

1) DPSCsの分離・培養

ヒト不用智歯を愛知学院大学および国立長寿医療研究センターの倫理審査委員会の承諾を得て愛知学院大学歯学部附属病院より患者の文書による同意を得た後、抜歯した。歯髄組織は0.2% Liberase MNP-S enzyme (Roche)にて分離し、歯髄細胞を10% ヒト血清および Antibiotic-Antimitotic solution (life technologies)含有 Dulbecco modified eagle's medium (DMEM)にて培養した。DPSCsは通常の酸素分圧では95% 空気(20% O₂)-5% CO₂で培養した。低酸素培養では、DPSCsはtri-gas incubator (AIRTECH, Tokyo)中で特別にデザインされたculture chamberを用いて培養した。そのculture chamberはoutlet filterにつながれO₂、CO₂およびN₂の混合ガス(3% O₂-6% CO₂-91% N₂)あるいは(5% O₂-6% CO₂-89% N₂)が絶えず安定的に供給され、また湿潤状態に保たれていた。低酸素培養のpH

は最終濃度 10mM HEPES buffer (Gibco)にて調整した。

2) 細胞および核の大きさの形態学的解析
細胞の形態学的変化は Giemsa 染色後倒立顕微鏡で観察し、取り込んだ画像から Image J software を用いて細胞および核の大きさを解析した。

3) フローサイトメトリーによる幹細胞マーカー発現分析
それぞれの酸素分圧で培養した 5 代目の DPSCs を Accutase にてはがし、CD105、CXCR4、G-CSFR、IgG1 isotype control および IgG2a isotype control で 4°C で 1 時間反応させ、FACSAria II flow cytometer (Becton Dickinson)にて分析した。

4) 細胞遊走能および増殖能解析
G-CSF に対する細胞遊走能に対して、TAXIScan-FL (Effector cell institute) を用いた水平走化性アッセイにて、低酸素で培養した 5 代目の DPSCs を通常培養の DPSCs と比較した。細胞遊走は 24 時間での細胞数を測定した。増殖能については、3 代目で 7 日間 duplicate で細胞をはがし細胞数を測定した。

5) Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析
Total RNA を通常と低酸素培養 5 代目の DPSCs から分離し、First strand cDNA を 1 μ g の total RNA より作製した。幹細胞マーカーの *Oct-4*、*Sox2* および *Nanog* および angiogenic/neurotrophic factors の *vascular endothelial factor (VEGF)*、*nerve growth factor (NGF)*、*brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* および *glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)*、また免疫調整に関係する因子、*indoleamine2,3-dioxygenase (IDO)*、*interleukin 10 (IL10)*、*Major histocompatibility complex class II (MHC-II)* および *human leukocyte antigen G5 (HLA-G5)* を light cycler (Roche Diagnostics)にて real-time RT-PCR を行った。 β -actin にて補正後、低酸素培養細胞と通常培養細胞の比を測定した。

6) secretome による trophic 効果
継代 4-5 代目を 60%コンフルエントで培地を無血清に変え、24 時間培養した上清を集めて Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit の ultracel-3 membrane (Millipore)を用いて 40 倍に濃縮した。

NIH3T3 (JCRB)において DPSC secretome の増殖促進効果を DMEM に 5 μ g/ml 添加して検討した。細胞数は 12、24、36 および 48 時間後に cell counting kit 8 (CCK8) (Dojindo Lab.)にて 450 nm で測定した (n=4)。

NIH3T3 において DPSC secretome の遊走促進効果を TAXIScan-FL にて測定した。画像は 24 時間撮影した。

神経突起伸長促進効果については、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y cell line を用いて、無血清下で 20%、5% および 3% O₂ 培養の DPSC secretome (5 μ g/ml) あるいは GDNF (PeproTech) (20ng/ml)を 48 時間添加し、神経突起の長さを Image J software を用いて解析した。

7) 統計学的解析
データは 平均値 \pm standard error で表現した。One way ANOVA を用いて、グループ間の有意差を測定し、P 値は unpaired Student's t-test (IBM SPSS version 19)を用いて計算した。P 値が 0.05 以下の場合統計学的有意差があると判断した。

(3) 微小重力環境での細胞培養の最適条件の検討

1) DPSCs の微小重力培養
正常ヒト智歯を(2)の 1)と同様に同意取得後抜歯し、歯髄組織を L-15(Lebovitz)中に溶解した 0.2% collagenase にて分散後、コロニー形成法により分離した DPSCs を 10% FBS 含有 DMEM 中で 4 代目まで培養した。DPSCs を 70% コンフルエント前に TrypLE select (Invitrogen) にてはがし、25ml の tissue culture flask に細胞数 5 \times 10⁴/3ml cells で播種し、細胞が接着するまで 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 6-8 時間待った後、三次元微小重力培養装置(Gravite[®])を用いて、下記の条件で培養した。

Rotation Speed:	Inner Frame (min ⁻¹)	Outer Frame (min ⁻¹)	Gravity Level (G)
Condition [i]	0.25	0.50	10 ⁻³ G
Condition [ii]	0.15	0.30	10 ⁻³ G
Condition [iii]	0.10	0.25	0.5 G

2) 増殖能測定
各微小重力条件 ((i)、(ii)、(iii)) による DPSCs の増殖能促進作用を通常重力と比較した。すなわち、7 日間、2-3 日ごとに培地交換し、細胞数カウントした。

3) フローサイトメトリーによる幹細胞表面マーカー 発現
フローサイトメトリー (FACSAria II (BD biosciences))により、各微小重力条件における幹細胞表面マーカー (CD105、CXCR4、CD271 および STRO1)の発現率を通常重力と 5 代目で比較した。

4) Real-time RT-PCR による解析
Total RNA を Trizol にて抽出し、First-strand cDNA 合成を DNase I 処理後 ReverTra Ace- α (Toyobo) にて行った。Real-time RT-PCR は Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、老化関連マーカー (*p53*、*p21*、*p16*、*IL-6*、*IL-8* および *IL-1 β*)、幹細胞マーカー (*OCT4*、*Nanog* および *Sox2*)、および trophic 因子 (*VEGF*、*BDNF* および

NGF)の mRNA 発現に関して、各微小重力と通常重力を比較した。

4. 研究成果

(1) 非特異的 DNA 損傷が見られないシングルセルへの剥離・解離法の検討

細胞をシングルセルにするための細胞の剥離方法を検討したが、トリプシン EDTA やトリプルセレクト等の酵素を使用する方法、スクレイパーにて物理的に細胞を剥離する方法のいずれでも、SCPFGEを行ったところ、非特異的な DNA 損傷が見られた。そこで、末梢血リンパ球を使用して SCPFGE を実施した。

しかし、やはり非特異的な DNA 損傷が見られた。その原因を探索したところ、サイトスピン標本作製する際の細胞への物理的衝撃によって、細胞内小器官が損傷を受け、その結果生じる活性酸素によって、DNA が損傷されていることがわかった。さらに、サイトスピン標本作製時の細胞膜の損傷部位から、培養液中に含まれる成分が細胞内に取り込まれ、活性酸素が産生され、DNA 損傷が生じていることが考えられた。

結局、非特異的 DNA 損傷を抑制する方法が見つからず、断念した。

(2) 低酸素分圧による最適な培養法

1) 低酸素培養による DPSCs 細胞形態の変化
分離した DPSCs は通常(20% O₂) および 低酸素 (5%および3% O₂) 培養において、初期ではすべての条件下で細胞は小さく紡錘形を示していたが、継代につれ、通常および低酸素培養での細胞形態は差が見られてきた。すなわち、通常酸素濃度では DPSCs は大きく、扁平になった。ギムザ染色では通常酸素培養に比べて低酸素培養細胞ではより核が大きいことが示された。細胞形態画像をさらに統計学的に分析すると、細胞の大きさは20% O₂ において5%および3% O₂ に比べて有意に大きかった。さらに、20% O₂ と比べて3% O₂ では核の大きさは有意に大きく、5% O₂ では20% O₂ および3% O₂ と比べて有意差はみられなかった。

2) 幹細胞マーカーの発現

5代目の20% O₂ および5% および3% O₂ 幹細胞マーカー CD105 発現率はほぼ同様であった。一方、5% O₂ および3% O₂ での CXCR4 発現率は20% O₂ に比べて有意に高かった。5% O₂ および3% O₂ の間での CXCR4 発現率の有意差はなかった。G-CSFR 発現率は5% O₂ において、20% O₂ および3% O₂ よりも有意に高かった。同様に3% O₂ では20% O₂ に比べて G-CSFR 発現率は有意に高かった。

3) 遊走能

5代目5% O₂ 培養での DPSCs は20% O₂ に比べて、より遊走能が高かった。すなわち、3、6、9、および12時間において、5% O₂ で培養

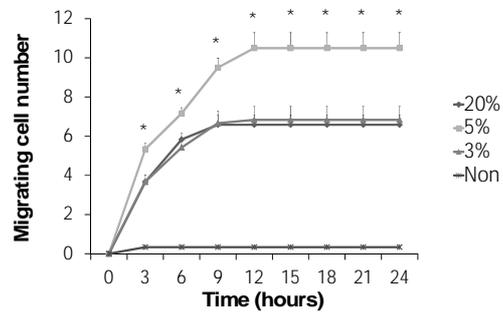


図1 5% oxygen cultures exhibited higher migration ability. Migrating cell number (mean ± S.E., n=4. *p<0.05).

した DPSCs は3% O₂ に比べて有意に遊走細胞数が多かった (p<0.05)。一方、3% O₂ と20% O₂ の間にはいずれの時間での有意差はみられなかった (図1)。

4) 増殖能

5% O₂ 培養での DPSCs は20% O₂ に比べて、培養5日目から細胞数は有意に高かった (図

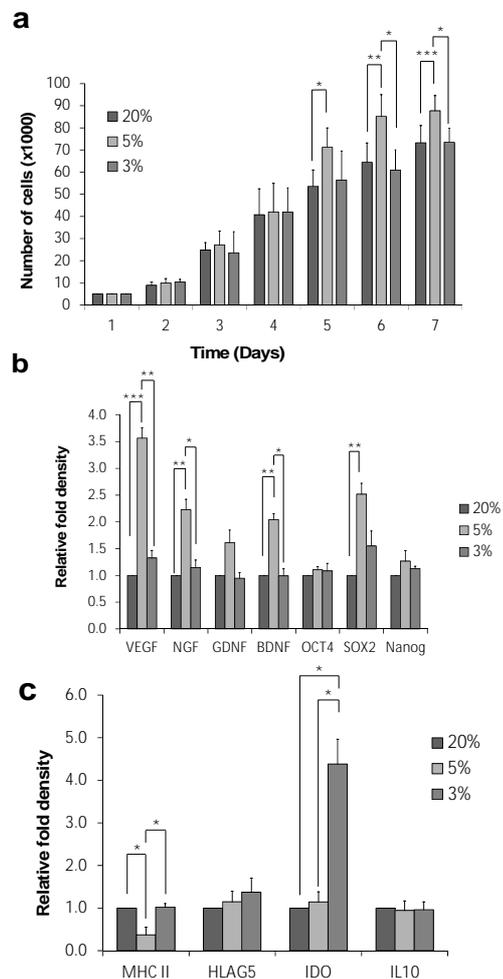


図2 Hypoxic cultures demonstrated better proliferation rate, higher expression of pluripotency markers, angiogenic/neurotrophic factors, and immunomodulatory genes. (a) Cell count. (b) Quantitative RT-PCR for mRNA levels of pluripotency markers and angiogenic/neurotrophic factors. (c) Quantitative RT-PCR for mRNA levels of immunomodulatory genes (mean ± S.E., n=4. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2a) 5% O₂ の細胞増殖能はさらに培養を続けるにつれ、より有意となった。3% O₂ と 5% O₂ の間には有意差があったが、3% O₂ と 20% O₂ の間には有意差はなかった。

5) 多能性幹細胞マーカー、trophic 因子および免疫調整因子 mRNA 発現

低酸素培養により *Nanog* および *Oct4* の mRNA 発現に変化はみられなかった。*Sox2* mRNA 発現は 5% O₂ で 20% O₂ と比べて有意に増加がみられたが、3% O₂ とは差がみられなかった。血管新生因子 *VEGF* および神経栄養因子 (*BDNF* および *NGF*) は 5% O₂ において 20% O₂ および 3% O₂ に比べて有意に高かった。*GDNF* 発現は 5% O₂ は 20% O₂ および 3% O₂ よりも高かったが、有意差はみられなかった (図 2b)。免疫調整因子 *IL10* は低酸素および通常培養で同等に発現していた。しかしながら、別の免疫関連因子 *IDO* は 3% O₂ は 5% および 20% O₂ に比べて有意に発現していた。一方、5% O₂ では 3% O₂ および 20% O₂ に比べて *MHC-II* の発現が有意に減少していた (図 2c)。

6) secretome の trophic 効果

低酸素培養での DPSC secretome は通常培養と比べて NIH3T3 細胞の増殖を促進した。5% O₂ secretome は 20% O₂ の secretome と比べて 24、36、および 48 時間において増殖を促進した。さらに、5% O₂ は 12、24、36 および 48 時間において、3% O₂ secretome と比べてより増殖促進効果が高かった。一方、48 時間で 3% と 20% O₂ は有意差がみられた (図 3a)。

5% O₂ の secretome は 3% および 20% O₂ と比較して、有意に NIH3T3 の遊走促進効果を有していた。6、9、12 および 15 時間において、5% O₂ と 3% O₂ secretome の間に遊走細胞数の差がみられた。同様に、5% O₂ secretome は 3、6、9、12 および 15 時間において遊走細胞数を 20% O₂ secretome に比べて増加させた。同様に、3% O₂ secretome は 20% O₂ と比べて 6、9、12 および 15 時間で有意に遊走細胞数を増加させた (図 3b)。

ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞において、低酸素培養の secretome は通常培養と比べて、神経突起伸長をより促進させた。すなわち 5% O₂ 培養の secretome は 3% O₂ および 20% O₂ 培養に比べて有意に神経突起伸長を促進させた。5% O₂ 培養の secretome は GDNF と同様に神経突起伸長を促進できたが、GDNF は 3% O₂ および 20% O₂ 培養の secretome よりも有意に神経突起伸長を促進した (図 3c および d)。

(3) 微小重力環境での細胞培養の最適条件

1) 微小重力環境での DPSCs の増殖

DPSCs は一週間培養し、経時的に細胞数を測定し、微小重力下での増殖活性を検討した。しかしながらすべての微小重力条件で通常重力と比べて増殖活性は変わらなかった。

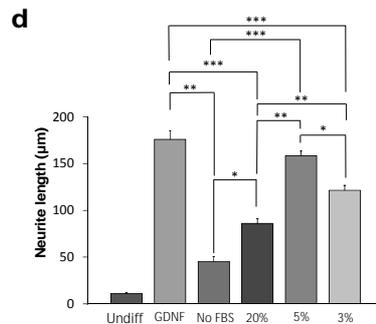
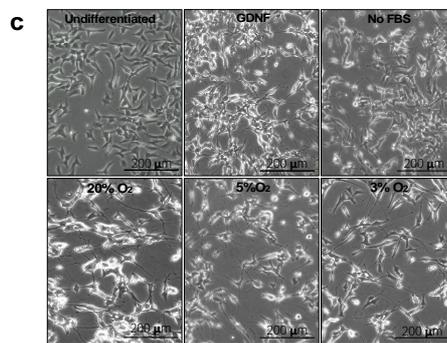
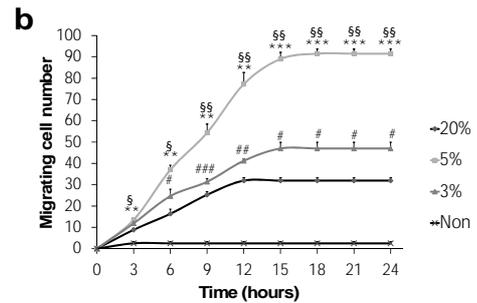
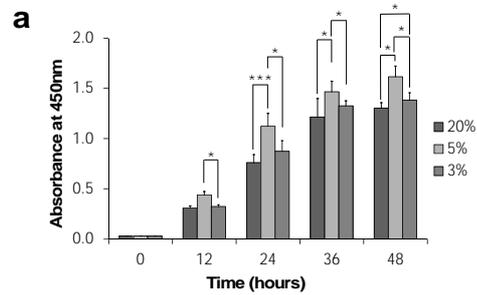


図 3 Secretome collected from 5% hypoxic cultures showed better effect on proliferation activity, migration ability, and neurite outgrowth. (a) Proliferation activity (*p<0.05, ***p<0.001) and (b) The migratory activity of NIH3T3 cells supplemented with secretome of each oxygen culture, (mean±S.E., n=4) 5% vs. 20% (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001), 3% vs. 20% (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001), 5% vs. 3% (§p<0.05, §§p<0.01) (c) Representative photos demonstrating the morphology of SH-SY5Y supplemented with secretome of each oxygen culture. (d) Quantitative analysis of SH-SY5Y neurite outgrowth. (mean±S.E., n=4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2) 微小重力環境での DPSCs の安定性

細胞の安定性に関して、*p53* および *p16* 発現は微小重力と通常重力環境下で変わりなかった。

次に細胞の品質として、幹細胞マーカー *Nanog* および *Sox2* の発現は微小重力

condition [iii] において通常重力に比べて高い傾向がみられた。しかしながら、*Sox2* の発現は、[iii]が [ii]と比べてやや高い傾向がみられた。また、trophic 因子、*BDNF* 発現は[ii] において通常重力よりもやや高かった。

さらに、老化マーカー*IL-6* 発現は[ii]において、通常重力に比べやや高い傾向がみられた。

これらの結果より、細胞の増殖、安定性、細胞品質に関して、用いた微小重力の条件では通常重力と比べて、ほとんど差はなかった。

その後、condition [ii]を用いて3継代続けて微小重力培養を行ったが、細胞の増殖も通常重力と変わらず、細胞老化マーカーの mRNA 発現や p16 の蛋白質発現および trophic 因子発現もほとんど差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

Albuquerque M.T.P., Valera M.C., Nakashima M., Nör J.E., Bottino M.C.: Tissue engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J. Dent. Res.* 93(12), 1222-1231, 2014. 査読有

DOI: 10.1177/0022034514549809

Hirose Y., Yamaguchi M., Kawabata S., Murakami M., Nakashima M., Gotoh M., Yamamoto T.: Effects of extracellular pH on dental pulp cells in vitro. *J Endod.* 42(5): 735-741, 2016. 査読有

DOI: 10.1016/j.joen.2016.01.019

Ahmed NE., Murakami M., Kaneko S., Nakashima M.: The effects of hypoxia on the stemness properties of human dental pulp stem cells (DPSCs). *Sci Rep.* 6:35476, 2016. 査読有 DOI: 10.1038/srep35476

[学会発表] (計9件)

Nakashima M.: Dental pulp stem cell biology and regeneration for clinical trial. the second international conference on dental and craniofacial stem cells (ICDCSC), Chengdu China, April 12, 2014.

Nakashima M.: Clinical evidences of stem cell-based therapies in regenerative endodontics. Symposium. Tissue engineering strategies for regenerative endodontics. The International Association for Dental Research (IADR), Cape Town, South Africa, June 26, 2014.

中島美砂子: 自己歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療法の臨床研究 第141回日本歯科保存学会秋季学術大会 山形 2014年10月31日

Nakashima M.: Dental Pulp Stem Cells Mobilized with Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration Clinical Trial. 5th Research Week International Symposium of Oral Medicine College of Oral Medicine. Taipei, May16, 2015.

中島美砂子: 歯の延命化を目指した歯髄

幹細胞自家移植による歯髄再生治療法の臨床研究 第33回日本骨代謝学会学術集会 東京 2015年7月24日

Nakashima M.: Dental pulp stem cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration: Phase I clinical trial.

Proceedings of International Conference on Clinical Trials, Orlando, July 27, 2015.

中島美砂子: 歯の延命化による健康長寿を目指した歯髄・象牙質再生治療法の現状と展望 シンポジウム「健康長寿と再生医療」日本学術会議歯学委員会主催、日本歯科医学会・日本歯学系学会協議会共催 東京 2015年12月13日

Ahmed N., Murakami M., Kaneko S., Nakashima M.: Optimizing oxygen conditions for expansion of human dental pulp stem cells (DPSCs) under controlled oxygen concentration. IADR Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016. Nagoya, June 27-28, 2016.

中島美砂子: 歯髄・象牙質再生治療の現状と未来 第23回日本歯科医学会総会 講演 福岡 2016年10月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 美砂子 (NAKASHIMA, Misako)
国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・部長
研究者番号: 20207773

(2) 研究分担者

兼子 智 (KANEKO, Satoru)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 40214457

山本 徳則 (YAMAMOTO, Tokunori)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)
・准教授
研究者番号: 20182636

栗田 賢一 (KURITA, Kenichi)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 40133483

村上 真史 (MURAKAMI, Masashi)
国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・特任研究員
研究者番号: 30614531

エンドrawn プラタマ (ENDRAWAN, Pratama)
国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・流動研究員
研究者番号: 10783491

(3) 研究協力者

庵原 耕一郎 (IOHARA, Koichiro)
アーメド ネルミン (AHMED, Nermeen)