

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462825

研究課題名(和文) アネキシンA5による腱・靭帯と骨付着部(enthesis)のリモデリングの制御

研究課題名(英文) Regulation of bone remodeling by Annexin A5 at tendon/ligament insertion sites

研究代表者

島田 明美(Shimada, Akemi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：00339813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Enthesisは、腱と骨の間に線維軟骨が介在する線維軟骨性付着とこれらが介在しない線維性付着に分類される。このうち線維軟骨性付着部では、生後7週以降、野生型に比べてAnxa5機能欠損マウスで特異的な皮質骨面積と線維軟骨層の増大を認めた。軟骨層には野生型と比べてアルカリフォスファターゼ活性の強い細胞がより多く観察された。一方、線維性付着部ではAnxa5欠損による影響を受けなかった。siRNAによってATDC5のAnxa5遺伝子をノックダウンすると軟骨分化マーカーの遺伝子発現が増大した。これらの結果は、Anxa5が腱・靭帯付着部の線維軟骨の分化と石灰化を負に制御することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Entheses can be further divided to fibrocartilaginous and fibrous entheses according to the type of tissue present at the skeletal attachment site. In Anxa5-deficient (Anxa5^{-/-}) mice, the sizes of bone ridge outgrowths at the fibrocartilaginous entheses of tibiae and femur were increased after 7 weeks of age. This bone overgrowth was not observed at the fibrous entheses where Anxa5-lacZ is hardly expressed. At the fibrocartilaginous entheses, more ALP-expressing cells were observed in the fibrocartilage layer outside of the bone in the mutant mice. Then, to examine the role of Anxa5 on cartilage differentiation, we performed Anxa5 gene knockdown in vitro using siRNA. Depletion of endogenous Anxa5 with siRNA increased mRNA expressions of differentiated marker of chondrocyte. Together, these results suggest that Anxa5 prevents bone overgrowth at the fibrocartilaginous entheses.

研究分野：歯科学

キーワード：Annexin a5 腱 靭帯 骨

1. 研究開始当初の背景

骨と靭帯・腱との接合部(enthesis)における機械的刺激による骨形成や骨リモデリングの分子メカニズムについては不明な点が多い。アネキシン A5 (Anxa5) はコラーゲン結合性タンパクとして軟骨細胞膜から単離されたアネキシンファミリーに属する分子であるが、後に抗凝血因子、メカニカルセンサー、アポトーシスシグナル伝達、細胞膜裏打ちタンパクとしての膜修復調節など多彩な機能が見出されている。

Anxa5 遺伝子の下流に lacZ を挿入した Anxa5 機能欠損マウス (Anxa5^{-/-}) の骨は、3カ月の若齢では野生型マウスとの顕著な差は認められないことが報告されている (Brachvogel et al, Mol Cell Biol 23:2907-13, 2003)。しかし興味深いことに、我々の予備検討により、生後 4 カ月以降で Anxa5^{-/-} では骨と腱・靭帯付着部のみが特異的に肥大していることを見出した。このことから、enthesis のリモデリングが Anxa5 を介して調節されているという仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Anxa5^{-/-} マウスの靭帯・腱と骨との接合部 (enthesis) を解析することにより、enthesis における機械的刺激による骨形成や骨リモデリングの分子調節因子としての Anxa5 の機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウス

本研究は鶴見大学歯学部動物実験委員会の承認を得ている。Anxa5^{+/-} マウスを交配し、産まれたマウスの遺伝子型 (Anxa5^{+/+}, Anxa5^{+/-}, Anxa5^{-/-}) を PCR により確認した。

(2) μ CT 解析と 3 次元再構築

生後 4, 7, 16, 40 週後に安楽死させ、摘出組織を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) / PBS で固定した。 μ CT (R_mCT2, RIGAKU) により撮像し、i-VIEW type R (モリタ) により石灰化組織の 3 次元再構築画像を得た。また、Latheta LCT-100 Lite (Aloka) により定量的解析を行った。

(3) 組織学的解析

摘出した下肢を 4%PFA/PBS で固定後、20% EDTA で脱灰し、OCT compound に凍結包埋した。厚さ 14 μ m の凍結切片を作成し、常法により、X-gal を用いた Anxa5-lacZ 染色、HE 染色、ウサギ抗 Anxa5 抗体 (1:100, BioVision) と Alexa Fluor[®]594-結合ニワトリ抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を用いた Anxa5 組織免疫染色、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色、酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ (TRAP) 活性染色を行った。

(4) 石灰化組織へのカルセイン取り込み

生後 21 週のマウスに 5mg/kg のカルセインを腹腔内投与し、17 日後に安楽死させた。摘出した下肢を 4%PFA/PBS で固定後、メチルメタクリレートに包埋した。厚さ 50 μ m の樹脂包埋切片を作成し、カルセインの蛍光を観察した。

(5) tenotomy による運動阻害

ペントバルビタール全身麻酔下で、生後 12 週のマウスの右前脛骨筋腱をメスで切断し、右下肢の運動を阻害した。手術から 8 週後にマウスを安楽死させ、下肢を摘出し、CT 解析と組織学的解析を行った。

(6) 細胞培養と Anxa5 ノックダウン

軟骨系間葉細胞株 ATDC5 を DME/Ham 's F-12 培地に 5%ウシ胎児血清, 0.01mg/mL insulin, 0.01mg/mL Apo-transferrin, 0.034 μ M sodium selenite を添加して培養した。jetPRIME (Polyplus-transfection) を用いて Anxa5 遺伝子に対する siRNA、あるいは Control siRNA を導入し、3 日後の mRNA を回収した。導入 3 日後の細胞増殖能を MTT 法で、遺伝子発現量を Agilent 社の SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ、およびリアルタイム qPCR 法で調べた。

4. 研究成果

(1) Anxa5 および Anxa5-lacZ の発現部位

成体マウスにおける Anxa5 の発現部位を Anxa5-lacZ の組織染色法により調べたところ、関節軟骨、骨膜、および骨と腱・靭帯付着部に特異的に発現していた。抗 Anxa5 抗体を用いた組織蛍光免疫染色によっても同様の結果が得られた。Enthesis は一般に、線維軟骨性付着と線維性付着に分類できるが、線維軟骨性付着である脛骨 - 腓腹筋腱、大腿骨 - 内転筋腱、および下顎骨 - 顎二腹筋腱の付着部では、線維軟骨層に Anxa5⁺ の細胞が多く分布していた。一方、線維性付着である脛骨 - 内側側副靭帯の付着部には Anxa5⁺ 細胞はほとんど観察されなかった。

(2) CT による石灰化組織の形態測定

Anxa5 欠損により entheses で生じる骨形態の変化をマイクロ CT により解析した。生後 4 週において、Anxa5^{-/-} と野生型の間に骨の顕著な差は認められなかった。生後 7 週以降の Anxa5^{-/-} マウスにおいて、線維軟骨性付着部では野生型に比べて特異的な肥大化を認めた。しかしこれらの骨においても、骨幹部における皮質骨断面積や骨密度には顕著な差は認められなかった。一方、脛骨と内側側副靭帯の間の線維性付着部においては、皮質骨の増大は顕著ではなかった。

(3) entheses の組織学的解析

腓腹筋と脛骨の線維軟骨性付着部に特に注目して組織学的解析を行った。HE 染色を行

ったところ、この部位において線維軟骨層の増大を認めた。また、線維軟骨層には、野生型と比べてアルカリフォスファターゼ活性の強い細胞が多く観察された。またカルセイン標識の結果、これらの細胞が石灰化に寄与することが示された。一方、TRAP 陽性細胞の数や分布に顕著な差は認められなかった。これらの結果から、Anxa5 は線維軟骨性付着部において、軟骨細胞に対する分化促進作用を有することが示唆された。

(4)tenotomy による機械的刺激の除去

生後 12 週に前脛骨筋に付着する腱を切断し、運動機能を制限したところ、Anxa5-lacZ マウスおよび野生型マウスのいずれにおいても、術後 8 週の腱付着部における脛骨皮質骨の縮小が認められた。Anxa5^{-/-}マウスにおける骨の表現型には筋運動によるメカニカルストレスが関与する可能性が示された。

(5)ATDC5 での Anxa5 ノックダウンの影響

軟骨細胞における Anxa5 の機能を解析する目的で、軟骨系未分化細胞株 ATDC5 を用いた *in vitro* での解析を試みた。siRNA によって Anxa5 遺伝子をノックダウンし、細胞増殖と遺伝子発現に対する影響を調べた。Anxa5 siRNA 導入によって、Anxa5 遺伝子発現は 80 ~ 90% 抑制された ($p < 0.001$)。Anxa5 siRNA 導入 4 日後の細胞増殖能は、Anxa5 ノックダウンにより約 23% 低下した ($p < 0.05$)。一方、分化形質の遺伝子発現の変化を解析したところ、Anxa5 ノックダウンによって type II, および type X collagen, Aggrecan などの軟骨分化マーカーの遺伝子発現が 10 ~ 25 倍増大した。

以上の結果は、Anxa5 が腱・靭帯付着部の線維軟骨の分化と石灰化を抑制的に制御する可能性を示唆するものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Yamashita T, Udagawa N, Thirukonda GJ, Uehara S, Yamauchi H, Suzuki N, Li F, Kobayashi Y, Takahashi N. Platypus and opossum calcitonins exhibit strong activities, even though they belong to mammals. *Gen Comp Endocrinol.* (査読有) 246:270-278, 2017. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.01.001.

Kawasaki M, Izu Y, Hayata T, Ideno H, Nifuji A, Sheffield VC, Ezura Y, Noda M. Bardet-Biedl Syndrome 3 regulates development of cranial base midline structures. *Bone.* (査読有) 101:179-190, 2016. DOI: 10.1016/j.bone.2016.02.017.

Komatsu K, Shibata T, Shimada A, Ideno H, Nakashima K, Tabata Y, Nifuji A.

Cationized gelatin hydrogels mixed with plasmid DNA induce stronger and more sustained gene expression than atelocollagen at calvarial bone defects *in vivo*. *J Biomater Sci Polym Ed.* (査読有) 27(5):419-30, 2016. DOI: 10.1080/09205063.2016.1139486

Kanzaki H, Shinohara F, Kanako I, Yamaguchi Y, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes. *Redox Biol.* (査読有) 8:186-191, 2016. DOI: 10.1016/j.redox.2016.01.006.

Ideno H, Nakashima K, Nifuji A. Roles of the histone methyltransferase G9a in the development and differentiation of mesenchymal tissues. *J Phys Fitness Sports Med.* (査読有) 4(5):357-362, 2015. DOI: 10.7600/jpfsm.4.357JPFMS

Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 463(4):1278-83, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102.

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* (査読有) 34(4):395-405, 2016. DOI: 10.1007/s00774-015-0683-1.

Horasawa N, Yamashita T, Uehara S, Udagawa N. High-performance scaffolds on titanium surfaces: osteoblast differentiation and mineralization promoted by a globular fibrinogen layer through cell-autonomous BMP signaling. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* (査読有) 46:86-96, 2015. DOI: 10.1016/j.msec.2014.10.025.

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, Takahashi N. Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. *PLoS One.* (査読有) 9(1):e85878, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085878. eCollection 2014.

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y. Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep.* (査読有) 4:4493, 2014.
DOI: 10.1038/srep04493.

Kanemoto S, Kobayashi Y, Yamashita T, Miyamoto T, Cui M, Asada R, Cui X, Hino K, Kaneko M, Takai T, Matsuhisa K, Takahashi N, Imaizumi K. Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. *J Cell Sci.* (査読有) 128(23):4353-65, 2015.
DOI: 10.1242/jcs.176057.

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Coordinated expression of H3K9 histone methyltransferases during tooth development in mice. *Histochem Cell Biol.* (査読有) 143(3):259-66, 2015.
DOI: 10.1007/s00418-014-1284-0.

Wada S, Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A. H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro. *Histochem Cell Biol.* (査読有) 144(1):13-20, 2015.
DOI: 10.1007/s00418-015-1318-2.

Shimada A, Wada S, Inoue K, Ideno H, Kamiunten T, Komatsu K, Kudo A, Nakamura Y, Sato T, Nakashima K, Nifuji A. Efficient expansion of mouse primary tenocytes using a novel collagen gel culture method. *Histochem Cell Biol.* (査読有) 142(2):205-15, 2014.
DOI: 10.1007/s00418-014-1191-4.

[学会発表](計28件)

和田悟史、出野尚、島田明美、上運天太一、中村芳樹、中島和久、木村宏、眞貝洋一、立花誠、二藤彰。腱組織形成におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能。第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

出野尚、小松浩一郎、島田明美、新井嘉則、中島和久、荒木良子、安倍真澄、立花誠、木村宏、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a の骨芽細胞分化における機能。第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

上運天太一、出野尚、島田明美、中村芳樹、木村宏、新井嘉則、立花誠、中島和久、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a のマウス歯牙発生における機能。第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

島田明美、新井嘉則、和田悟史、出野尚、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、中村芳樹、二藤彰。Annexin a5 による腱・靭帯付着部 (enthesis) における骨増大の抑制。第 2 回日本アネキシン研究会年会, 2016 年 11 月 5 日, 札幌医科大学 (北海道, 札幌市)

上運天太一、出野尚、島田明美、中村芳樹、中島和久、木村宏、立花誠、二藤彰。マウス歯牙形成過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能。第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016 年 7 月 20-23 日, 大阪国際会議場 (大阪府, 大阪市)

島田明美、新井嘉則、和田悟史、出野尚、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、網塚憲生、中村芳樹、二藤彰。Annexin a5 による腱・靭帯付着部 (enthesis) における線維軟骨層の石灰化の制御。第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016 年 7 月 20-23 日, 大阪国際会議場 (大阪府, 大阪市)

Kamiunten T, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Kimura H, Tachibana M, Nakashima K, Nifuji A. Essential roles of H3K9MTase G9a during tooth development. *ASCB annual meeting*, 2015 年 12 月 12 ~ 16 日, サンディエゴ (アメリカ)

Ideno H, Komatsu K, Shimada A, Kamiunten T, Arai Y, Nakashima K, Araki R, Nakamura Y, Abe M, Tachibana M, Kimura H, Nifuji A. Histone methyltransferase G9a is essential to progress osteoblastic differentiation in vitro, and skull bone formation in vivo. *ASCB annual meeting*, 2015 年 12 月 12 ~ 16 日, サンディエゴ (アメリカ)

和田悟史、出野尚、島田明美、上運天太一、中村芳樹、中島和久、木村宏、眞貝洋一、立花誠、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a 遺伝子欠損による腱の形成阻害。第 38 回日本分子生物学会, 2015 年 12 月 1 ~ 4 日, 神戸国際展示場 (神戸市, 兵庫県)

Ideno H, Komatsu K, Shimada A, Kamiunten T, Arai Y, Nakashima K, Araki R, Nakamura Y, Abe M, Tachibana M, Kimura H, Nifuji A. Deletion of G9a, histone methyltransferase, causes impaired bone formation. *ASM 2015, Joint ANZBMS, MEPSA and MBSANZ Annual Scientific Meeting*, 2015

年 11 月 1~4 日, Hotel Grand Chancellor, Hobart, タスマニア(オーストラリア)

Wada S, Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Tachibana M, Nifuji A. Histone 3 lysine 9 methyltransferase G9a is essential for the growth and differentiation of tenocytes. ASBMR 2015 annual meeting, 2015 年 10 月 9~12 日, シアトル(アメリカ)

Shimada A, Arai Y, Wada S, Ideno H, Kamiunten T, Nakashima K, Komatsu K, Yamashita T, Ezura Y, Amizuka N, Pöschl E, Brachvogel B, Nakamura Y, Nifuji A. Annexin A5 inhibits bony outgrowth at tendon/ligament insertion sites. ASBMR 2015 annual meeting, 2015 年 10 月 9~12 日, シアトル(アメリカ)

氏家優子、島田明美、小松浩一郎、大島朋子、二藤彰、大井田新一郎、五味一博。歯周病モデルにおける好中球エラストラーゼ阻害剤の歯周組織に与える影響。第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 9 月 12 日, アクトシティ浜松(静岡県, 浜松市)

上運天太一、出野尚、中村芳樹、中島和久、島田明美、二藤彰。ヒストン 3 リジン 9 メチル化酵素 G9a は正常な歯牙発生に必要な。第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年 9 月 13 日, 朱鷺メッセ(新潟県, 新潟市)

島田明美、小松浩一郎、新井嘉則、大貫芳樹、中島和久、山下照仁、奥村敏、二藤彰。アネキシン A5 欠損マウスは歯の咬耗と腱附着部における顎骨の肥大を呈する。第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年 9 月 13 日, 朱鷺メッセ(新潟県, 新潟市)

上運天太一、出野尚、島田明美、中島和久、中村芳樹、木村宏、立花誠、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a 遺伝子の歯胚間葉における欠損は歯の成長阻害を生ずる。第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 24 日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)

出野尚、小松浩一郎、島田明美、上運天太一、新井嘉則、中島和久、荒木良子、中村芳樹、安倍真澄、立花 誠、木村宏、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウスは骨形成阻害を示す。第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 24 日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)

和田悟史、出野尚、島田明美、上運天太一、中村芳樹、中島和久、木村宏、立花誠、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a は腱細胞の増殖および分化に必須である。第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 24 日, 京王

プラザホテル(東京都, 新宿区)

島田明美、新井嘉則、和田悟史、出野尚、上運天太一、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、網塚憲生、中村芳樹、二藤彰。Annexin a5 による腱・靭帯附着部(enthesis)における骨形成の調節。第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 24 日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)

上運天太一、出野尚、島田明美、中島和久、中村芳樹、二藤彰。歯の発生分化におけるヒストンメチル化酵素の発現と機能。第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, 横浜パシフィコ(神奈川県, 横浜市)

②島田明美、和田悟史、出野尚、上運天太一、小松浩一郎、工藤明、中村芳樹、中島和久、二藤彰。Annexin A5 欠損マウスは咀嚼筋肥大、歯の咬耗、口腔顔面の骨肥大を呈する。第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, 横浜パシフィコ(神奈川県, 横浜市)

②上運天太一、出野尚、島田明美、中島和久、中村芳樹、二藤彰。歯の発生分化におけるヒストンメチル化酵素の発現と機能。第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 26 日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

③和田悟史、出野尚、島田明美、上運天太一、中島和久、中村芳樹、二藤彰。腱細胞の発生分化におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能。第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 26 日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

④出野尚、島田明美、上運天太一、和田悟史、小松浩一郎、中村芳樹、安倍真澄、中島和久、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a による間葉系細胞の増殖と分化の調節。第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 26 日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

⑤出野尚、島田明美、上運天太一、和田悟史、小松浩一郎、荒木良子、立花誠、中村芳樹、安倍真澄、中島和久、二藤彰。間葉系細胞の増殖・分化過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能。第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24 日, 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市)

⑥上運天太一、島田明美、出野尚、中村芳樹、木村宏、立花誠、中島和久、二藤彰。ヒストン 3 リジン 9 メチル化酵素群 (G9a, Glp, Suv39h1, Prdm2) のマウス歯牙発生における発現と機能。第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014 年 7 月 24 日, 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市)

⑦和田悟史、島田明美、出野尚、立花誠、中

村芳樹、中島和久、二藤彰。ヒストンメチル化酵素 G9a による臍細胞の分化制御。2014 年 7 月 26 日，大阪国際会議場(大阪府，大阪市)

⑳ 島田明美、和田悟史、出野尚、上運天太一、小松浩一郎、工藤明、中村芳樹、中島和久、二藤彰。効率的で安定的なマウス臍細胞の初代培養法。第 32 回日本骨代謝学会学術集会，2014 年 7 月 26 日，大阪国際会議場(大阪府，大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田明美 (SHIMADA, Akemi)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：00339813

(2) 研究分担者

二藤 彰 (NIFUJI, Akira)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：00240747

和田 悟史 (WADA, Satoshi)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：20581119

山下 照仁 (YAMASHITA, Teruhito)
松本歯科大学総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号：90302893

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

新井 嘉則 (ARAI, Yoshinori)