

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390417

研究課題名(和文) 歯槽骨増生を目的とした破骨細胞と骨芽細胞の骨代謝共役機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of bone remodeling mechanism between osteoblasts and osteoclasts for the alveolar bone regeneration

研究代表者

宇田川 信之 (Udagawa, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70245801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：OPG<sup>-/-</sup>マウスの歯槽骨吸収について解析した結果、OPG遺伝子の欠損によって著しい歯槽骨吸収が惹起されることを見出した。しかし、OPG<sup>-/-</sup>マウスと同様に骨粗鬆症を呈するRANKLの強発現マウスにおいては、歯槽骨吸収は認められなかった。また、正常マウスの皮質骨や歯槽骨においては、骨細胞にOPGの発現が認められるが、海綿骨においてはOPG発現が認められない。以上の実験結果から、バイオミネラル(石灰化組織)の脱結晶化(骨吸収)に関与するRANKLのデコイ受容体であるOPGは、骨細胞が産生することによって石灰化組織の結晶化状態を保つ働きを担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：OPG-deficient mice (OPG KO) exhibited severe osteoporosis due to enhanced osteoclastogenesis when they grew to be adults. In RANKL-Tg mice, a soluble form of RANKL is expressed under the control of the human serum amyloid P component promoter. RANKL-Tg mice exhibit osteopenia characterized by excessive bone resorption. Alveolar bone loss in OPG KO mice and RANKL-Tg mice was evaluated using micro computed tomography and histological techniques. We show that OPG KO but not RANKL-Tg mice exhibit severe alveolar bone destruction. OPG was highly expressed in osteocytes in the alveolar bone, suggesting that OPG secreted from osteocytes prevents the alveolar bone loss induced by the excess amount of RANKL in RANKL-Tg mice. Treatment with an anti-RANKL antibody as well as risedronate, a bisphosphonate, significantly inhibited the alveolar bone loss in OPG KO mice. These results suggest that OPG KO mice are a useful model for screening therapeutic agents in periodontology.

研究分野：口腔生化学

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞 骨代謝共役 歯槽骨 歯周病 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である (Udagawa N et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 87:7260, 1990)。破骨細胞とその前駆細胞は RANK を発現し、骨芽細胞との細胞間接触を介して破骨細胞分化因子である RANK ligand (RANKL) を認識し、破骨細胞に分化する。RANKL または RANK をノックアウトしたマウスでは破骨細胞が全く認められず、重篤な大理石骨病を発症することから、RANKL-RANK シグナル系は破骨細胞の分化に必須であることが証明された。マウスに、RANKL のデコイ受容体である OPG を過剰発現させると、骨吸収が抑制された重篤な大理石骨病を呈する。

我々は現在までの研究において、歯周疾患をはじめとする局所性の骨吸収における RANKL と OPG の重要性を明らかにした (図 1)。歯周疾患による歯槽骨吸収は、病原細菌の感染により惹起され、最終的に歯の脱落に至る。この歯槽骨破壊の原因のひとつが歯周ポケットに存在するグラム陰性菌由来のリポ多糖 (LPS) にある。LPS は Toll 様レセプター (TLR) ファミリーの 1 つである TLR4 に認識され、マクロファージや線維芽細胞などからの炎症性サイトカイン産生を強く誘導する。そしてこれらの炎症性サイトカインが骨芽細胞の細胞膜表面上に RANKL の発現を誘導し、破骨細胞の分化と活性化を誘導する。さらに LPS は直接骨芽細胞に作用することで RANKL を発現誘導し、TLR のアダプター因子である MyD88 を介して破骨細胞の分化と活性化を誘導することを明らかとした (J. Exp. Med. 200:601-611, 2004)。

今回我々が計画した研究においては、破骨細胞から骨芽細胞への RANKL のリバースシグナルを解明することである。そして、これらの基礎的研究成果を基にして、歯槽骨吸収の予防及び残存する歯槽骨を保存する薬剤の開発を目指す。さらに、細胞移植を用いた歯槽骨 (顎骨) 増生方法の確立は、重度の歯周病に対する画期的な治療法の開発に直結すると信じている。

## 2. 研究の目的

骨のリモデリングとは、骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されることにより、古い骨が新しい骨に置換されていくことである。この骨吸収と骨形成の量は、動的に均衡した共役状態に保たれたカップリング現象を示す。我々は、破骨細胞の分化と骨吸収機能を制御する骨芽細胞に発現する RANKL 分子を発見した。しかし、骨形成を制御する破骨細胞からの信号伝達は全く不明である。本研究の目的は、破骨細胞に発現する RANKL の受容体である RANK シグナルが、骨芽細胞に作用し骨形成を促進するというリバースシグナルの存在を明らかにすることである。この新しいシ

グナルの解明を基盤として、歯周病の進行による歯の喪失が惹起する歯槽骨吸収を予防すると共に、歯槽骨の再生を目指したトランスレーショナルな研究に発展させていきたい。

## 3. 研究の方法

破骨細胞の分化と骨吸収機能の分子機構の解明により、RANKL 中和抗体やカテプシン K 阻害剤などの新たな骨吸収抑制剤が開発され、代謝性骨疾患治療薬の地図が塗り替えられようとしている現在、骨吸収と共役して骨形成を促進する薬剤の開発が望まれている。そこで、本研究においては、各種の骨吸収抑制薬や骨吸収不全マウス (大理石骨病マウス)、歯槽骨吸収モデルマウスなどを用いた BMP 誘導性異所性骨形成モデルにより、骨吸収と骨形成の共役機構の本体を明らかにする。強い骨形成活性を有している歯髓細胞に関する細胞生物学的研究も発展させる。また、破骨細胞分化における新たなシグナルである IL-34 の生理作用について解析する。さらに、2 年前から開始している患者由来の骨髄間質細胞移植による歯槽骨再生に関する臨床的研究を発展させ、歯槽骨増生における細胞移植の有効性について検証する。

(1) BMP 誘導性の異所性骨形成モデルを用いた骨代謝共役機構の解析

骨吸収不全大理石骨病マウスを用いたこれまでの我々の実験結果から、破骨細胞または破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ系の細胞において発現する RANK の発現が骨形成において重要なリバースシグナルとして伝達される可能性が示唆された。そこで、RANK のシグナルが伝達されないモデルとして RANKL 欠損大理石骨病マウスを用いた BMP 誘導性骨形成実験を詳しく行う。また、RANKL 中和抗体を使用した *in vivo* 実験も併せて実施する。

骨細胞 (オステオサイト) や癌細胞における RANKL の重要性が示唆されている。また、骨のリモデリングに、骨細胞が産生するスクレロステチンがネガティブに関与することも注目されている。メカニカルストレスや炎症性サイトカインがスクレロステチン発現を阻害することにより骨形成促進のシグナルを発信する可能性も示されているので、スクレロステチン中和抗体を用いた実験も計画する。

(2) 破骨細胞分化におけるインターロイキン 34 の作用解析

破骨細胞の分化には、RANKL と共に骨芽細胞が産生するサイトカインである M-CSF が必須である。我々は最近、この M-CSF の代替因子として脾臓に発現する IL-34 が破骨細胞分化に関与する可能性を見出した。そこで、IL-34 の作用について、その発現調節機構を明らかにすると共に、脾臓摘出モデルを用いた *in vivo* 解析などを計画する。

M-CSF と IL-34 の作用の違いについては、マイクロアレイ解析により、そのシグナル伝

達因子の探索を行う。

#### (3) 歯髓細胞を用いた骨形成促進作用

マウス歯髓細胞を用いた我々の実験結果から、歯髓細胞の有する高い石灰化能力は、カルシウムチャネル(Anxa8)やリン酸トランスポーター(Slc20a2)の高発現、MGPやピロリン酸合成酵素(ENPP1)の低発現などに起因する可能性が示された。これらの *in vitro* の実験結果をさらに発展させ、新規の骨形成促進薬剤の開発を目指す。

#### (4) 歯槽骨吸収モデルマウスを用いた骨形成促進機構の解析

我々は、これまでに重篤な骨粗鬆症を呈する OPG 遺伝子欠損マウスを用いて、骨組織における骨代謝共役機構の存在様式について研究を行ってきた。OPG 欠損マウスは全身性の骨吸収の亢進と共に骨形成の促進が共役して認められるモデルである。このマウスを用いて、我々は、新規かつ簡便な歯槽骨吸収モデルを作製することに成功した。

現在、ビスホスホネートは骨粗鬆症の治療薬として広く用いられている。しかし、骨吸収の阻害と共に、骨形成も同時に抑制してしまい骨代謝回転を低下させてしまうことが大きな問題点である。

最近、破骨細胞が分泌するカテプシン K の阻害剤(オダナカティブ)が、骨形成活性を抑制することなく、骨量を増加させることが示された。カテプシン K 阻害剤は破骨細胞の分化誘導の過程には影響を与えずに、成熟破骨細胞の骨吸収活性に対して特異的な阻害活性を示す。そこで、OPG 欠損マウスに対するオダナカティブ投与実験を行い、骨吸収を抑制しながら、骨代謝回転を低下させずに骨形成を促進する分子機構について詳しく検討する。

#### (5) 歯槽骨再生を目指した自己骨髄間質細胞移植に関する臨床的研究

患者自身の骨髄間葉系幹細胞を用いた歯槽骨再生療法に関しては、平成 21 年 9 月 10 日に舩添要一厚生労働大臣による「ヒト幹細胞臨床研究実施計画」の承認が得られた。その後現在までの 2 年間に於いて既に 7 名の患者の上顎洞に対する細胞移植を行っている。

細胞移植の骨形成に対する効果の定量的解析については、MRI を用いた解析方法を世界に先駆けて確立した。すなわち、MRI を用いた T2 強調アイディアル水画像を用いた硬組織形成部位の特定方法である。この方法を用いることにより、放射線被曝が無い条件での経時的な詳しい骨形成解析を行うことが可能となった。

プレリミナリーな結果であるが、症例 2 の術後 4 ヶ月後の上顎洞における MRI 解析による硬組織形成像(ボーンブリッジ)は、細胞移植側において、反対側(細胞無し)と比較して強い骨形成能が認められた。

#### (6) 破骨細胞からの骨形成リバースシグナルの解析

破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ

や成熟破骨細胞に発現する RANK のシグナル伝達が骨芽細胞に対してリバースに作用するという仮説が平成 24 年度において立証されたならば、RANK の骨芽細胞に対するシグナルが実際に骨形成促進作用を示すか否かについて、マウスおよびヒト由来未分化間葉系細胞を用いて詳しく検討する。

#### 4. 研究成果

歯周病において、歯槽骨の吸収は歯の喪失を引き起こす。現在までに、歯周病に骨吸収関連遺伝子が関与している可能性を示す患者由来の歯肉溝滲出液を用いた報告がなされてきた。そこで、我々は骨吸収関連遺伝子として OPG の歯周病への関与を明らかにするため、OPG<sup>-/-</sup>マウスと RANKL 遺伝子強発現マウス(RANKL Tg)の歯槽骨を解析した。野生型(WT、C57BL/6)、OPG<sup>-/-</sup>マウス、RANKL Tg マウスの下顎第一臼歯の根分岐部における歯槽骨をマイクロ CT 装置で撮影して、骨量を定量的に測定すると共に、ヒトと同様の基準で歯槽骨吸収を評価するため、マウスの上顎臼歯のセメントエナメル境から歯槽骨頂(CEJ:ABC)までの距離を測定した。

(1) マイクロ CT 画像に示されるように、12 週齢の OPG 欠損マウスにおいて、歯槽骨の著しい吸収が観察された。また、12 週齢の野生型マウスの歯槽骨量は約 60%であったが、OPG<sup>-/-</sup>マウスの骨量は約 25%に減少していた。

(2) RANKL Tg マウスにおいては、顕著な歯槽骨吸収は認められなかった。

(3) 各種マウス血清中の骨代謝マーカーを測定した。OPG<sup>-/-</sup>マウスは OPG が発現していないので RANKL/OPG 比は無限大に大きくなるが、RANKL Tg マウスの RANKL/OPG 比も正常マウスと比較して 40 倍近くに増大する。野生型マウス、OPG<sup>-/-</sup>マウス、RANKL Tg マウスの RANKL/OPG 比は、骨吸収マーカーである血清 TRAP5b 活性と相関した。

(4) それぞれのマウスの歯槽骨における破骨細胞の出現と OPG タンパク質の発現について検討した。その結果、OPG<sup>-/-</sup>マウスのみ歯槽骨が多孔質化し、骨の内部と表面で破骨細胞が顕著に増加した。一方、野生型マウスや RANKL Tg マウスの歯槽骨は多孔質化せず、OPG 陽性の骨細胞が明瞭に認められた。これらのマウスにおける大腿骨皮質骨の多孔質化と OPG の発現様式も歯槽骨と同様であった。しかしながら、大腿骨海綿骨における OPG 陽性骨細胞はほとんど認められなかった。

以上の結果より、骨細胞が産生する OPG が皮質骨や歯槽骨の維持に重要な役割を果たしていることが示された。また、OPG の発現低下は歯周病の進行にも関与する可能性が示唆される。

(5) この OPG<sup>-/-</sup>マウスにおける歯槽骨吸収をビスホスフォネートまたは抗 RANKL 中和抗体で抑制できるかを検討した。8 週齢の OPG<sup>-/-</sup>マウスにビスホスフォネート(リセドロネート)を 4 週間投与(0.1 mg/kg/週 2 回)、抗 RANKL

中和抗体を1回(5 mg/kg)投与し、歯槽骨吸収を評価した。その結果、これらの骨吸収抑制剤投与により、OPG<sup>-/-</sup>マウスの歯槽骨吸収の亢進は著明に抑制され、骨量は増大した。

以上の結果をまとめると、OPG<sup>-/-</sup>マウスの歯槽骨吸収について解析した結果、OPG 遺伝子の欠損によって著しい歯槽骨吸収が惹起されることを見出した。しかし、OPG 遺伝子欠損マウスと同様に骨粗鬆症を呈する RANKL の強発現マウスにおいては、歯槽骨吸収は認められなかった。また、正常マウスの皮質骨や歯槽骨においては OPG の発現が認められるが、海綿骨においては OPG 発現が認められなかった。

(6) 破骨細胞前駆細胞であるマクロファージや成熟破骨細胞に発現する RANK のシグナル伝達が骨芽細胞に対してリバースに作用するという仮説を立証するための実験を行った。

正常マウス骨髄細胞における RANKL 誘導性の破骨細胞形成に対して W9 は TRAP 陽性多核破骨細胞形成を濃度依存的に抑制した。W9 (100 μM) 添加群において、TRAP 陽性多核細胞形成が完全に阻害されたが、ALP 陽性の骨芽細胞は多数出現した。W9 (200 μM) 添加群においては、ALP 陽性骨芽細胞からなる Nodule 形成が著明に認められた。

正常マウス由来の骨芽細胞上では、ビタミン D や PTH の存在下で破骨細胞が形成され、W9 ペプチドは破骨細胞分化を阻害すると共に ALP 陽性の骨芽細胞の分化を促進した。BMP-2 や PTH による ALP 陽性の骨芽細胞誘導に対しても W9 ペプチドは促進作用を示した。一方、RANKL 欠損マウス由来の骨芽細胞上の共存培養系においては、ビタミン D や PTH などの存在下でも破骨細胞の誘導は認められなかった。また、RANKL 欠損マウスの骨芽細胞は正常マウス骨芽細胞と比較して ALP 活性が弱く、W9, BMP-2, PTH による ALP 陽性の骨芽細胞誘導活性も弱かった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Takahashi N, Udagawa N and Suda T (2014) Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep* 3:495 (査読有)

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

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

Nakayama T, Thirukond GJ, Nagasawa S,

Kawahara I, Udagawa N, Yagami K, Kawatani M, Osada H, Doi Y, Yoshinari N and Takahashi N (2014) Osteoclasts polarize on dental implant materials as if they were on bone. *J Oral Biosci* 56:136-42 (査読有)

Nakamichi Y, Horibe K, Takahashi N and Udagawa N (2014) Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss. *Odontology* 102:137-46 (査読有)

Naruse K, Udagawa N, Garg A, Nakamura M and Nakano K (2014) Vertical ridge augmentation using allograft and synthetic hydroxyapatites after strategic extraction. *Clin Adv Periodontics* 4:81-7 (査読有)

Mochizuki N, Sugino N, Ninomiya T, Yoshinari N, Udagawa N and Taguchi A (2013) Association of cortical shape of the mandible on panoramic radiographs with mandibular trabecular bone structure in Japanese adults: a cone-beam CT-image analysis. *Oral Radiol* : Doi 10.1007/s11282-013-0155-z (査読有)

Udagawa N, Koide M, Nakamura M and Takahashi N (2013) Minocycline to be used as a potential anti-bone resorption agent due to the suppression of osteoclastic bone resorption. *Journal of Oral Biosciences* 55, 16-22 (査読有)

Nakamichi Y, Udagawa N and Takahashi N (2013) IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J Bone Miner Metab* 31:486-95 (査読有)

Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N and Udagawa N (2013) Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology* 140:344-51 (査読有)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N (2013) Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154:773-82 (査読有)

Furuya Y, Inagaki A, Khan M, Mori K, Penninger JM, Nakamura M, Udagawa N, Aoki K, Ohya K, Uchida K, Yasuda H (2013) Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. *J Biol Chem* 288:5562-71 (査読有)

[学会発表](計 13 件)

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual

Meeting 2014年9月 Arctigenin Inhibits Osteoclastogenesis by Suppressing Both Calcineurin-Dependent and Osteoblastic Cell-Dependent NFATc1 Pathways: Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y and Takahashi N (JBMR 29: pS170, SA0262) George R. Brown Convention center (Houston, USA)

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting 2014年9月 Possible role of RANKL-RANK signal in osteoblast differentiation: Nakamura M, Yamashita T, Nakamichi Y, Furuya Y, Yasuda H and Udagawa N (JBMR 29: pS163, SA0215) George R. Brown Convention center (Houston, USA)

歯科基礎医学会学術大会(第56回)2014年9月 発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源: 溝口利英, 宇田川信之, 高橋直之 (第56回歯科基礎医学会学術大会抄録集: p45, 01-E14) 福岡国際会議場(福岡市博多区)

歯科基礎医学会学術大会(第56回)2014年9月 抗炎症作用を持つアルクチゲニンの破骨細胞抑制メカニズム: 山下照仁, 小林泰浩, 上原俊介, 宇田川信之, 李峰, 門田重利, 江角浩安, 高橋直之 (第56回歯科基礎医学会学術大会抄録集: p181, P1-171) 福岡国際会議場(福岡市博多区)

日本骨免疫会議 第1回 2014年7月 抗炎症作用を持つアルクチゲニンの破骨細胞抑制メカニズム: 山下照仁, 小林泰浩, 上原俊介, 宇田川信之, 李峰, 門田重利, 江角浩安, 高橋直之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, 0P1-1) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 W9ペプチドのヒト破骨細胞分化抑制作用とヒト骨芽細胞分化促進作用: 中村美どり, 米田統一, 徳田吉彦, 山下照仁, 中道裕子, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, 0P2-3) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 硬組織再生におけるヒト歯髄細胞と骨髄間葉細胞の有用性についての比較解析: 中道裕子, 徳田吉彦, 萩原貴寛, 堀部寛治, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, 0P2-5) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 関節炎においてSfrp5の発現低下は骨破壊を増悪する: 小林泰浩, 前田和洋, 中村幸男, 加藤博之, 宇田川信之, 高橋直之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p221, 0P3-7) 万国津梁館(名護市)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 RANKL-RANKシグナルの骨芽細胞分化促進作用の可能性: 中村美どり, 山下照仁, 堀部寛治, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之 (第32回日本骨代謝学会プログラム抄録

集: p252, P1-04) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 Wnt5aはLRP5/6の発現を介して古典経路を調節し、骨芽細胞分化を促進する: 岡本正則, 宇田川信之, 上原俊介, 前田和洋, 山下照仁, 中道裕子, 斉藤直人, 高橋直之, 小林泰浩 (第32回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p253, P1-05) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 Wnt5a-Ror2シグナルは、Daam2-Rhoを介して骨吸収機能を促進する: 上原俊介, 山下照仁, 中村貴, 加藤茂明, 宇田川信之, 高橋直之, 小林泰浩 (第32回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p256, P1-11) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本小児歯科学会大会(第52回)2014年5月 神経成長因子 Netrin-1のBMPとNogginによる軟骨細胞および骨芽細胞分化における役割: 中村浩志, 八上公利, 定岡直, 中村美どり, 宇田川信之, 大須賀直人 (小児歯科学雑誌52巻2号抄録集: p369, P-2-50) 品川区立総合区民会館(東京都品川区)

日本小児歯科学会大会(第52回)2014年5月 骨形成ペプチドW9の破骨細胞形成抑制とカップルした骨芽細胞分化誘導作用: 中村美どり, 中村浩志, 宇田川信之, 大須賀直人 (小児歯科学雑誌52巻2号抄録集: p370, P-2-51) 品川区立総合区民会館(東京都品川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70245801

### (2) 研究分担者

小出 雅則 (KOIDE, Masanori)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号: 10367617

中村 美どり (NAKAMURA, Midori)  
松本歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 90278177

中道 裕子 (NAKAMICHI, Yuko)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号: 20350829

上原 俊介 (UEHARA, Syunsuke)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 90434480

田口 明 (TAGUCHI, Akira)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70243582

### (3) 連携研究者

安孫子 宜光 (ABIKO, Yoshimitu)

日本大学・歯学部・教授  
研究者番号：70050086

下平 滋隆 (SHIMODAIRA, Shigetaka)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号：80345751