

**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：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463192

研究課題名(和文)独自の視点からのヒト歯髄幹細胞の同定、選択的濃縮および特性解析

研究課題名(英文) Preferential enrichment and characterization of human dental pulp stem cell via a genetic engineering-based approach

研究代表者

稲田 絵美 (Inada, Emi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：30448568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルカリ性フォスファターゼ(ALP)を発現するものが真の歯髄幹細胞と考え、ALP陽性細胞を初代培養歯髄細胞から遺伝子工学的に濃縮し、その特性を解析することを目的とした。遺伝子導入効率が高いとされるpiggyBacトランスポゾンを用いて蛍光遺伝子を歯髄細胞に遺伝子導入した結果、効率的に遺伝子導入安定株を取得できた。そこで、ALP promoterの制御下、EGFPとpuromycin耐性遺伝子を同時発現するトランスポゾン型プラスミドを導入し、薬剤選別を行なった。残念ながら、その過程で細胞が劣化し、増殖を止めた。目下、親株の特性を保持したまま不死化が可能な細胞株を樹立し、再実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：Alkaline phosphatase (ALP) is a useful marker for stem cells that differentiate into human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs). In this study, we attempted to enrich for ALP-positive cells from HDDPCs via a genetic engineering-based approach. We employed a PiggyBac (PB)-based gene transfer system, which is known to be effective for the enrichment of transfectants. We found that this system is useful for acquiring transfectants when HDDPCs are transfected with PB vectors carrying cDNA for enhanced green fluorescent protein (EGFP). Subsequently, a PB vector carrying the EGFP cDNA and a puromycin resistance gene under the control of the ALP promoter was introduced into HDDPCs together with a transposase expression vector. Unfortunately, this caused accidental arrest of cell proliferation. To overcome this problem, we successfully created a HDDPC-derived immortalized cell line, which will be used as a source for ALP-positive HDDPCs.

研究分野：小児歯科

キーワード：歯髄幹細胞 PiggyBacシステム 選択的濃縮 アルカリフォスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

乳歯をオーダーマイド再生医療へ応用するため、tooth bank 設置の動きが国内のみならず世界的にも拡大しつつある (Arora et al., J Clin Pediatr Dent 33, 289-94, 2009; Huang, J Exp Clin Med 2, 111-7, 2010)。もし、若い時期に乳歯を提供した患者が、将来何らかの理由で歯の損傷を受けた場合、その損傷部位を自分の細胞で補い、永久歯を再構築できれば、患者の QOL に大いに貢献できる。その可能性を睨み、既にいくつかのラボでは、様々な歯 (乳歯や智歯など) から歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells: DPSCs) と称される細胞を濃縮し、その特性解明 (分化ポテンシャル、増殖性、遺伝子発現パターンなど) が行われている。その結果、DPSCs の特性について、以下のような知見が集積されている。1) 幹細胞は骨髄内の多能性幹細胞である間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) のような繊維芽細胞様の形態を示す (Gronthos et al., PNAS 97, 13625-30, 2000)、2) 増殖性は MSCs と比肩するほど、高い (Miura et al., PNAS 100, 5807-12, 2003)、3) 脂肪細胞や骨細胞への分化多能性を有する (Zhang et al., Tissue Eng 12, 2813-23, 2006)、4) Hoechst 33342 などの蛍光色素による染色に対し抵抗性を示す (いわゆる side population [SP] としての性質を示す) (Iohara et al., Tissue Eng Part A 17: 1911-20, 2011)、5) 歯構成細胞の分化を促すようなリン酸 Ca で構成される 3 次元的な単体 (scaffold) に細胞を埋め込み、これを免疫不全マウス皮下に移植すると、象牙芽細胞などの歯構成細胞が生じ、象牙質形成が起こる (Couple et al., Calcif Tissue Int 66, 129-38, 2000)。しかしながら、研究の多くは歯髄の初代細胞 (即ち、細胞集団が多彩) をそのまま実験に用いており、SP として単離する以外、特定の細胞集団を選択的に濃縮する試みはされていない。

申請者はこれまで、乳歯から初代培養で確立した DPSCs を用いて様々な検討を進めてきた。例えば、ES/iPS 細胞や初期胚細胞で未分化マーカーとして認知されるアルカリ性フォスファターゼ (ALP) について、その活性を細胞化学的に検出すると、6~12 歳頃の患者 5 検体の初代培養細胞で ALP 活性が高いものと低いものとがあった。しかも、ALP 活性が高い検体でも、ALP 陽性細胞と陰性細胞とが混合した状態であった。従って、DPSCs を再生医療に利用する場合、初代培養細胞から何らかの方法で特定の DPSCs を選定し、濃縮する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

申請者は患者 5 検体から得た歯髄細胞 (dental pulp cells: DPCs) から iPS 細胞を樹立する試みを行い、実際、幾つかの iPS 細胞株樹立に成功した。その過程で、DPCs の特性と iPS 細胞のでき易さには相関性があ

ることに気が付いた。即ち、ALP 活性が高く、増殖性が高いもの、OCT4 や NANOG など他の幹細胞特異的遺伝子発現が高いものが iPS 細胞になり易いという結果を得た (Inada et al., 2016)。

一般的に、繊維芽細胞などの分化細胞から初期化するよりも、未分化な幹細胞から初期化した方が iPS 細胞化し易いという。従って、ALP 活性が高い DPCs に DPSCs が多く含まれると考えた。このような DPSCs の特性を解析するには、先ず、ALP 陽性細胞を培養 DPCs から単離する必要がある。ALP は細胞膜に局在するが、ALP 抗体を用いた FACS による選別は手技的な困難さが予想される。そこで、遺伝子工学的手法でそれを得ることを考えた。

即ち、本研究では、1) ALP プロモーター (ALPp) + 蛍光遺伝子 + 薬剤耐性遺伝子導入 DPCs 安定株 (ALP 陽性) を樹立する、2) 当該細胞の幹細胞としての可能性について分子生物学的、生化学的解析に、また、その分化多能性を *in vitro*, *in vivo* から検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

前述の目的遂行には、DPCs への効率的な遺伝子導入方法の確立が求められる。先行研究で電気穿孔法に基づく Neon® Transfection system (Invitrogen: 現有設備) を用いて DPCs に遺伝子導入を行なった。すると、70% 以上の細胞が transfection された。しかし、残念ながら、理由は不明だが、その後の薬剤選別による安定株取得は不可能であった。そこで、哺乳類細胞への効率的な遺伝子導入に有効とされるトランスポゾン的一种 *piggyBac* の適用を考えた。

まず、*piggyBac* 系を用いて ALP 陽性細胞のみを選別するためのプラスミド pT-AEIN (後述) を構築する。初代培養の歯髄細胞に pT-AEIN と transposase 発現プラスミド pTrans を共遺伝子導入し、EGFP 発現を指標とする ALP 陽性細胞を選択的に濃縮する。次いで、得られた ALP 陽性細胞株の DPSCs としての可能性を検討すべく、分子生物学的、生化学的解析を行う。さらに、機能的な側面を探るべく、*in vitro*, *in vivo* での象牙芽細胞への分化能 (象牙質形成誘導) などを含む多分化能性についても検討を加える。

### 1) ALP 陽性細胞で特異的に EGFP と neo を発現するプラスミド pT-AEIN の作製

pT-AEIN は Transposase が認識し、結合する acceptor 部分 (PB と呼ぶ) を両端に配し、その内側にユニアリアルサルファターゼ由来のインスレーター (Ars) (Watanabe et al., Genes Cells 11, 1009-21, 2006) 更にその内側に ALPp で支配される EGFP と neo が配置される構造をとる (図 1)。ALPp (1.2 kb; Yusa et al., J Leukoc Biol 68, 772-7, 2000) はヒト由来で既に入手済み。Ars は pT-AEIN がホスト染色体に組み込まれた際、周りの染色体からのマイナスの影響 (遺伝子サイレン

シング)を遮断する働きがあり、Ars 内の発現ユニット (ALPp + EGFP + IRES + neo) を正常に機能 (発現) させる。

## 2) DPCs への pT-AEIN プラスミドの遺伝子導入と組換え細胞の単離、評価

pTrans と pT-AEIN の 2 種のプラスミドを 1:1 (各 1 μg) の比率で混合し、この混合液に DPCs (5 X 10<sup>5</sup>) を加え、電気穿孔をかける。細胞内に導入された pTrans から transposase が発現され、これが PB 部位を内蔵する pT-AEIN プラスミドの PB 部位に結合し、プラスミド骨格を残し、発現ユニットのみが宿主染色体の AATT 部位に挿入される(図 1)。遺伝子導入後、G418 を含む培地で細胞を選別し、生じたコロニーを拾い、EGFP, ALP 発現の有無を蛍光顕微鏡下、あるいは細胞化学的染色で確認する。また、細胞を更に拡張し、最終的にゲノム DNA の PCR 解析で pT-AEIN がゲノムに組み込まれていることを確認する。

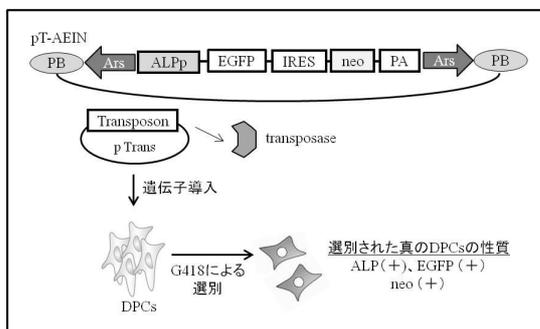


図 1 : pT-AEIN プラスミドの遺伝子導入と組換え細胞の単離

## 3) pT-AEIN 導入 ALP 陽性組換え細胞の特性解析

得られた細胞が幹細胞としての特性を備えるかを確認するため、幹細胞特異的マーカー (OCT4, NANOG, REX-1, ALP, ABCG2, LEF-1 など) の発現を RT-PCR 法で、Hoechst 33342 による染色への抵抗性などを解析する。

## 4 . 研究成果

まず初めにトランスポゾンによる遺伝子導入法の初代 DPCs に対する有効性を検討するため、細胞に蛍光遺伝子を内蔵するトランスポゾンと pTrans を共に Neon system を用い遺伝子導入を行った。その結果、効率的に遺伝子導入株が取得でき、且つ長期培養後も導入遺伝子が脱落せず、その発現が持続されることが示された。また、通常は導入遺伝子の種類が増えると、遺伝子の導入効率が著しく低下するが、本システムでは 2 種類の蛍光遺伝子を一つの細胞に同時に導入し、且つ両方の遺伝子を同時に発現させることもできた。以上の事から、piggyBac 系を用いた遺伝子導入法は有効であることが示された (Inada et al., 2015)。

遺伝子工学的に ALP 陽性細胞が初代 DPCs

に存在するかを調べるために、ALPp の制御下 EGFP を発現するプラスミド pALPE を DPCs へ一過的に遺伝子導入を試みた結果、EGFP を発現する DPCs が見られた (右下図)。

次に、ALP 陽性安定株を得るために、ALPp の制御下 EGFP と puromycin 耐性遺伝子 (pac) を



同時発現するトランスポゾン型プラスミド pTA-ALPEIP を構築した。本来であれば、ALP 陽性安定株を得るために、pT-AEIN を用いるべきであるが、puromycin を用いた選別が後日最も優れており、且つ、生じるコロニーの形態も良好であることが判ったため、neo の代わりに pac を用いることにした。得られた pTA-ALPEIP と pTrans とを共に DPCs に遺伝子導入後、puromycin で選別し、遺伝子導入安定株を増殖させる試みを行ったが、選別後に細胞が劣化することが頻繁に見られ、解析可能な細胞数を確保することが困難だった。

そこで、別の試みとして、DPCs を single cell にした後、ALP 活性検索用の組織化学染色を行い、陽性細胞を実体顕微鏡下 mouthpiece で制御される micropipette を用いて single cell を採取する試みを行った。具体的には、培養用 plastic dish にて増殖した DPCs を 0.25% Trypsin-EDTA で剥離する。浮遊細胞を 4%ホルマリン固定後、ALP 活性検出キットで細胞化学染色し、室温暗室にて一晚静置後、4%牛胎児血清(FBS)を含むリン酸 buffer (FBS -PBS) に置換する。この ALP 染色細胞懸濁液を非接着性 plate 上に 20 μL 滴下する。上述の micropipette を用いて実体顕微鏡観察下 ALP 陽性、陰性細胞それぞれを単一細胞として分取し、FBS-PBS 滴内で洗浄後、tube 内の 1 μL FBS-PBS 滴に単一細胞として収める。その結果、single cell の状態で採取することが可能であった。今後、単一細胞から cDNA を増幅させ、ALP やその他幹細胞マーカー遺伝子の mRNA について各種解析を行う予定である。

ヒトなどの初代培養細胞では、ヘイフリック限界 (Hayflick limit) と呼ばれる分裂回数制限があるため、ある回数の細胞分裂を行った後、細胞増殖が止まる。従って、上記で述べた細胞の劣化の問題は、想定された問題でもあった。現状では、初代 DPCs を扱う限り、このような問題につき当たる。そこで、この問題を解決すべく、上記と並行して「細胞の不死化」を行った。一般的に、細胞分裂の回数はテロメアの長さに依存する。テロメア伸長酵素 telomerase を初代培養細胞で強制発現させると、分裂回数制限が解除され、永遠に増殖可能な状態 (細胞不死化、immortalization と呼ばれる) となる。我々

は telomerase 活性を誘導するヒト telomerase 触媒サブユニット (hTERT) 遺伝子を *piggyBac* 系を用いて DPCs に導入した。その結果、親株の特性を保持したまま、不死化細胞株を樹立することができた。今後、得られた不死化細胞株を用い、ALP 陽性細胞の単離、増殖を試みる予定である。

#### 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](19件)

1. Inada E, Saitoh I, Kubota N, Soda M, Matsueda K, Murakami T, Sawami T, Kagoshima A, Yamasaki Y, Sato M: Alkaline phosphatase and OCT-3/4 as useful markers for predicting susceptibility of human deciduous teeth-derived dental pulp cells to reprogramming factor-induced iPSCs. *J Investig Clin Dent*. Sep 18 [Epub ahead of print], 2016. DOI: 10.1111/jicd.12236 ( 査読有 )

2. Sato M, Maeda K, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K: The piggyBac-Based Gene Delivery System Can Confer Successful Production of Cloned Porcine Blastocysts with Multigene Constructs. *Int J Mol Sci*. 17: pii: E1424., 2016. DOI: 10.3390/ijms17091424 ( 査読有 )

3. Saitoh I, Sato M, Inada E, Iwase Y, Murakami T, Soda M, Ohshima H, Hayasaki H, Noguchi H: Tissue-Specific Stem Cells Obtained by Reprogramming of Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse-Derived Pancreatic Cells Confer Insulin Production in Response to Glucose. *PLoS One*. 11: e0163580, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163580. ( 査読有 )

4. Inada E, Saitoh I, Watanabe S, Aoki R, Miura H, Ohtsuka M, Murakami T, Sawami T, Yamasaki Y, Sato M: PiggyBac transposon-mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants derived from cultured primary human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs) and HDDPC-derived iPSC cells. *Int J Oral Sci*. 7: 144-154, 2015. DOI: 10.1038/ijos.2015.18 ( 査読有 )

5. Inada E, Saitoh I, Yu Y, Tomiyama D, Murakami D, Takemoto Y, Morizono K, Iwasaki T, Iwase Y, Yamasaki Y: Quantitative evaluation of toothbrush and arm-joint motion during tooth brushing.

*Clin Oral Investig*. 19: 1451-1462, 2015. DOI: 10.1007/s00784-014-1367-2. ( 査読有 )

6. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal*. 10: 143-153, 2015. DOI: 10.1002/biot.201400283. ( 査読有 )

7. Saitoh I, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Murakami T, Soda M, Kubota N, Hasegawa H, Akasaka E, Matsumoto Y, Oka K, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M. Choice of feeders is important when first establishing iPSCs derived from primarily cultured human deciduous tooth dental pulp cells. *Cell Med*. 8: 9-23, 2015. DOI: 10.3727/215517915X689038 ( 査読有 )

8. Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Generation of -1,3-Galactosyltransferase-Deficient Porcine Embryonic Fibroblasts by CRISPR/Cas9-Mediated Knock-in of a Small Mutated Sequence and a Targeted Toxin-Based Selection System. *Reprod Domest Anim*. 50: 872-880, 2015. DOI: 10.1111/rda.12565. ( 査読有 )

9. Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S8, Miyoshi K. Direct Injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into Cytoplasm of Parthenogenetically Activated Porcine Oocytes Causes Frequent Mosaicism for Indel Mutations. *Int J Mol Sci*. 16: 17838-17856, 2015. DOI: 10.3390/ijms160817838. ( 査読有 )

10. Inada E, Saitoh I, Murakami D, Kubota N, Takemoto Y, Iwasaki T, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H, Yamasaki Y: Relationship between nasal and skeletal landmarks on lateral cephalograms of adults. *Aust J Forensic Sci*. 46: 339-347, 2014. ( 査読有 )

11. Murakami D, Inada E, Saitoh I, Takemoto Y, Morizono K, Kubota N, Iwasaki T, Oku T, Yamasaki Y: Morphological differences of facial soft tissue contours from child to adult of Japanese males: A three-dimensional cross-sectional study. *Arch Oral Biol*. 59: 1391-1399, 2014. ( 査

読有 )

12. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y. An efficient and convenient method for MiniPrep analysis of recombinant plasmids. *J Biomed Sci Eng.* 7: 105-107, 2014. DOI:10.4236/jbise.2014.73013 ( 査読有 )

13. Iwasaki T, Takemoto Y, Inada E, Sato H, Suga H, Saitoh I, Kakuno E, Kanomi R, Yamasaki Y: The effect of rapid maxillary expansion on pharyngeal airway pressure during inspiration evaluated using computational fluid dynamics. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 78: 1258-1264, 2014. DOI: 10.1016/j.ijporl.2014.05.004. ( 査読有 )

14. Sato M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent in vivo electroporation in mice. *Biotechnology Journal.* 8: 1355-1361, 2013. DOI: 10.1002/biot.201300169 ( 査読有 )

15. Yamada-Ito C, Saitoh I, Yashiro K, Inada E, Maruyama T, Takada K, Hayasaki H, Yamasaki Y: Smoothness of Jaw Movement during Gum Chewing in Children with Primary Dentition. *Cranio.* 31: 260-269, 2013. ( 査読有 )

16. Sato M, Maeda S, Inada E, Saitoh I, Kubota N: Mosaic Expression of Pluripotency-Related Proteins Oct-3/4 and Alkaline Phosphatase in Human Pancreatic Carcinoma Cell PANC-1, *Advanced Studies in Biology.* 5: 157-172, 2013. ( 査読有 )

17. Sato M, Kubota N, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: HeLa cells consist of two cell types, as evidenced by cytochemical staining for alkaline phosphatase activity: A possible model for cancer stem cell study. *Adv Stem Cells*, Article ID 208514, 15 pages, 2013. DOI: 10.5171/2013.208514 ( 査読有 )

18. Murakami T, Saitoh I, Inada E, Kurosawa M, Iwase Y, Noguchi H, Terao Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M: STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells in view of elimination of contaminated bacteria and promotion of cellular outgrowth. *Cell Med.* 6(1-2); 75-81, 2013. DOI: 10.3727/215517913X674234 ( 査読有 )

19. Iwasaki T, Saitoh I, Takemoto Y, Inada E, Kakuno E, Kanomi R, Hayasaki H, Yamasaki Y: Tongue posture improvement and pharyngeal airway enlargement as secondary effects of rapid maxillary expansion: A cone-beam computed tomography study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 143: 235-245, 2013. doi: 10.1016/j.ajodo.2012.09.014. ( 査読有 )

[学会発表](計8件)

1. Murakami T, Saitoh I, Inada E, Soda M, Suzuki A, Sawami T, Kagoshima A, Iwase Y, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M, Genetic engineering-based isolation of deciduous dental pulp stem-like cells. AADR, 2016年3月16-19日 (Los Angeles, USA).

2. Soda M, Saitoh I, Inada E, Murakami T, Suzuki A, Sawami T, Kagoshima A, Iwase Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M, ALP as a reliable marker for predicting early reprogramming. AADR, 2016年3月16-19日 (Los Angeles, USA).

3. Soda M, Saitoh I, Inada E, Murakami T, Iwase Y, Kubota N, Sawami T, Matsumoto Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Ohshima H, Sato M, piggyBac-transposon-mediated gene-delivery efficiently generates stable transfectants from HDDPCs and HDDPC-derived-iPSCs. IADR, 2015年3月11-14日 (Boston, USA).

4. 稲田絵美, 佐藤正宏, 齊藤一誠, 窪田直子, 澤味規, 村上智哉, 左右田美樹, 早崎治明, 山崎要一, ヒト乳歯歯髄細胞のアルカリホスファターゼ活性とOCT3/4発現はiPS細胞樹立の可否を予測する有効なマーカーである, 第53回日本小児歯科学会大会, 2015年5月21-22日, 広島国際会議場(広島県 広島市)

5. Murakami T, Saitoh I, Iwase Y, Inada E, Mastuyama J, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M, Multipotency of juvenile human buccal epithelial cells. AADR, 2014年3月19-22日, (North Carolina, USA).

6. 稲田絵美, 齊藤一誠, 窪田直子, 松本祐子, 村上智哉, 澤味規, 山崎要一, PiggyBacトランスポゾンによるヒト乳歯歯髄細胞からの遺伝子導入安定株の効率的取得, 第52回日本小児歯科学会, 2014年5月16-17日, きゅりあん(東京都 品川区).

7. 村上智哉, 齊藤一誠, 稲田絵美, 岩瀬陽子, 長谷川大子, 窪田直子, 松本祐子, 大島邦子, 岡 暁子, 山崎要一, 早崎治明, ヒ

ト乳歯歯髄由来 iPS 細胞樹立におけるフィーダー細胞選択の重要性, 第 51 回日本小児歯科学会, 2013 年 5 月 23-24 日, 長良川国際会議場 (岐阜県 岐阜市).

8. 郡山美優, 稲田絵美, 齋藤一誠, 三浦浩美, 大塚正人, 中村伸吾, 桜井敬之, 渡部聡, 三好和睦, 佐藤正宏, トランスポゾン PiggyBac システムによる複数遺伝子のブタ細胞への同時導入, 第 106 回日本繁殖生物学会, 2013 年 9 月 12-14 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス (東京都 府中市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲田 絵美 (INADA, Emi)

鹿児島大学病院・助教

研究者番号: 30448568

### (2) 研究分担者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)

鹿児島大学・医用ミニブタ先端開発研究センター・教授

研究者番号: 30287099

研究者番号: 30287099

齋藤 一誠 (SAITOH, Issei)

新潟大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 90404540

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)

琉球大学医学部・教授

研究者番号: 50378733