

〔原著〕

歯原性上皮細胞株の分化における活性型ビタミンD₃の作用村田 佳織¹⁾, 谷村 明彦²⁾, 齊藤 正人¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部口腔構造機能発育学系小児歯科学分野

2) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野

Effect of active form of vitamin D₃ in the differentiation of rat dental epithelial cell lineKaori MURATA¹⁾, Akihiko TANIMURA²⁾, Masato SAITOH¹⁾1) Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

2) Division of Pharmacology, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Active form of vitamin D₃, Ameloblast, Ameloblastin, Calcification**Abstract**

The active form of vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃; VD₃) regulates growth and differentiation in many cell types, through the activation of the VD₃ receptor (VDR) which is a nuclear receptor that is known to change various genetic expressions. In the present study, we examined the effect of VD₃ in the differentiation of ameloblasts using a rat dental epithelial cell line, SF2 cells. The VD₃ inhibited the proliferation of the SF2 cells in a concentration-dependent manner, and the cell number was reduced to approximately 50% of the control by 100 nM VD₃ at 3 days of cell culture. The VD₃ had enhanced the expression of ameloblastin

and connexin 43 at 24 hours after incubation, implying that VD₃ promotes the differentiation of SF2 cells; SF2 cells were also cultured in osteogenic media for 10 days, and the effects of VD₃ on the calcification and the differentiation of the SF2 cells were examined with Alizarin red S staining and alkaline phosphatase activity. The VD₃ promoted the formation of calcium nodules in the presence of 1.0–2.0 mM CaCl₂. In addition, ALP activity increased 6-fold in the presence of 100 nM VD₃. Overall, these results indicate that VD₃ induced differentiation of SF2 cells.

緒 言

ビタミンDは脂溶性ビタミンの一つで、小腸からのカルシウム吸収の促進、腎臓からのカルシウム排出抑制、骨から血中へのカルシウム放出促進などによって、血中カルシウムの恒常性維持に関与しており、ビタミンDの不足によって、くる病や、骨軟化症が引き起こされることが古くから知られている。ビタミンD₃は紫外線照射された皮膚上で作られ、肝臓での水酸化により25-ヒドロキシビタミンD₃ [25(OH)D₃] となり、さらに腎臓の近位尿細管での水酸化によって1α, 25-ジヒドロキシビタミンD₃ (活性型ビタミンD₃: VD₃) となる。

VD₃は核内受容体であるVD₃受容体(VDR)に結合して、様々な細胞の遺伝子発現を変化させることが知られている。骨形成におけるVD₃の作用として、VD₃が骨芽細胞のVDRを介するWnt/β-cateninの発現上昇によって、骨形成を誘導することが報告されている(Larriba, et al., 2013)。また、げっ歯類の骨芽細胞では、VD₃とNotch経路が協調してオステオポンチンの転写を誘導し、骨のリモデリングを行っている可能性が報告されている(Shen & Christakos, 2005)。

一方、エナメル質形成におけるVD₃の直接的な作用についてはよく分かっていない。Molar-Incisor Hypomineralization (MIH)は近年ヨーロッパを中心に提唱

されている第一大臼歯と切歯の限局したエナメル質形成不全であり、血清中の25(OH)D₃濃度の低下により起こることが報告された (Kuhnisch, et al., 2015). また、ビタミンD₃がエナメル上皮腫由来細胞の分化に参与する可能性も示唆されている (山本, et al., 2007). これらのことからビタミンDは、エナメル芽細胞の分化や石灰化にも関係すると考えられが、詳細は不明である。

歯の原基である歯胚は、口腔上皮由来の歯原性上皮細胞と神経堤由来の間葉細胞から形成される。これらの上皮-間葉相互作用を通して、規則正しい細胞の配列や細胞移動、一定の細胞増殖と細胞分化、さらに細胞死の調節が行われ、歯の形態形成が進行する。この過程において、内エナメル上皮から形成される前エナメル芽細胞が、アメロジェニン、アメロプラスチン (AMBN)、エナメルリンといったエナメルマトリックスタンパクを分泌するエナメル芽細胞に分化する。エナメル質は、これらのタンパク質の厳密な時間的・空間的調節により形成されると考えられている。

SF 2 細胞は前エナメル芽細胞株として歯の発生メカニズムの研究に用いられている。特にAMBN高発現型のSF 2 細胞であるSF 2-24細胞が、マウス由来iPS細胞をエナメル芽細胞へ分化誘導することや、歯髄幹細胞を象牙質シアロリントタンパク質発現細胞へ分化誘導することが報告されている (Arakaki, et al., 2012). しかし、SF 2 細胞のエナメル芽細胞への分化過程については明らかにされていない。

そこで、本研究では前エナメル芽細胞の分化におけるVD 3の作用を明らかにするために、SF 2 細胞を用いてエナメル芽細胞の分化におけるVD 3の作用を検討した。

材料および方法

1. 材料

ラット歯原性上皮細胞 (SF 2 細胞) は東北大学福本教授より供与された。培養液には10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Buckinghamshire, England) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12, Gibco, MA, U.S.A) を使用した。石灰化実験での培養液は 2 mM L-Glutamine (Gibco), 50 µg/ml L (+) - Ascorbic Acid (Kanto Chemical, Tokyo, Japan), 10mM β-Glycerophosphate disodium salt hydrate (Sigma, MO, U.S.A), 10% FBS含有 MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (Sigma) を使用した。

2. 試薬

1 α, 25 - Dihydroxyvitamin D₃ (VD 3, Sigma) は Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical Industries) にて100 µMとなるように調整し、実験に用いる時に 3, 10, 30および100 nMとなるように調整した。

3. 細胞増殖能の測定

VD 3 添加による細胞増殖能の変化を確認するために、経時変化とVD 3 濃度による変化を観察した。経時変化の解析では、SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/mlで播種し、細胞定着後 (24時間後)、VD 3 を 100 nM 添加し、1, 3, 5, 7 および10日培養後の細胞数を血球計算板にてカウントした。濃度による変化の解析では、SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/mlで播種し、細胞定着後 (24時間後)、VD 3 を 3, 10, 30 および100 nM 添加して3日間培養後の細胞数を血球計算板にてカウントした。コントロールにはVD 3 の溶媒のDMSOを添加した。

4. 免疫蛍光組織化学染色

SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/mlでNunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide (Thermo Scientific, Yokohama, Japan) に播種し、24時間後にVD 3 を 100 nM 添加した。VD 3 添加24時間後および72時間後にPBSで洗浄し、20分間固定 (アセトン:メタノール = 1 : 1) した。固定したサンプルをPBSで洗浄して、4%スキムミルクで30分間ブロッキングを行った。その後PBSで洗浄し、一次抗体としてRabbit polyclonal抗アメロプラスチン抗体 (Santa-Cruz, Texas, U.S.A) および抗コネキシン43 (CX43) 抗体 (Invitrogen, Yokohama, Japan) を 1% BSA 含有PBSで200倍希釈し、4℃にてover nightで反応させた。その後、0.1% BSA 含有PBSで洗浄後、二次抗体としてAlexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) を 1% BSA 含有PBSで200倍希釈し、室温にて1時間反応させた。洗浄後、核を Dapi Fluoromount-G (Dapi, Southern-Biotech, AL, U.S.A) を用いて染色し、組織封入剤にて封入後、x40油浸対物レンズ (NA = 1.30) を取り付けた共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon EZ-C 1) を用いて観察を行った。

5. 石灰化誘導能の解析

1) アリザリンレッドS染色

SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/mlで播種し、DMEM/F12で24時間培養後、VD 3 およびCaCl₂を加えた石灰化実験用培養液で10日間培養した。この実験で使用したVD 3 は100 nMで、CaCl₂は 0 mM, 1 mMもしくは2 mM添加し、

CaCl₂の総量を1.8 mM, 2.8 mMおよび3.8 mMとした。培養後の細胞を70%エタノールで冷却固定, 洗浄し, アリザリンレッドS (Sigma) で5分間染色した。

2) アルカリフォスファターゼアッセイ (ALP assay)

アリザリンレッドS染色後のプレートをpH7.0に調整したCetylpyridinium chloride (Sigma) で脱色を行い, ラボアッセイ™ ALP (Wako Pure Chemical Industries) にてALP assayを行った。検体をp-ニトロフェニルリン酸を含む緩衝液中で15分間作用させ, 検体中のアルカリフォスファターゼによりp-ニトロフェニルリン酸がp-ニトロフェノールとリン酸に分解される反応により, 検体中のアルカリフォスファターゼ活性を測定した。生成したp-ニトロフェノールはBIO-RAD model 680 micro plate readerで405 nmの吸光度を測定し求めた。

6. 統計処理

一元配置分散分析を行ったのち, Tukey法, Scheffe法, Fisher法にて検定を行い, 有意差検定を行った。なお, 有意水準P<0.05で有意差ありとした。

結 果

1. SF2細胞の増殖に対するVD3の作用

VD3の増殖能への影響を調べるために, VD3の存在下および非存在下でSF2細胞の培養を行い, 細胞数を測定した。図1は100 nMのVD3存在下および非存在下で, 1, 3, 5, 7および10日間の培養後の細胞数を測定した結果である。VD3添加によって, 培養3日目からSF2細胞の増殖抑制が認められた(図1)。SF2細胞に3, 10, 30および100 nMのVD3を添加した3日間培養後の細胞数は, コントロール群では約80x10⁵ cells/mlなのに対して, VD3添加群では約60x10⁵, 55x10⁵, 50x10⁵および40x10⁵ cells/mlとVD3濃度に依存した増殖抑制が認められ, 血中正常値の中央値である100 nMのVD3によって約50%に低下することが分かった(図2)。

2. VD3によるAMB NおよびCX43発現への影響

VD3添加時の細胞の分化程度を観察するために, AMBNとCX43の発現を免疫蛍光組織化学染色で観察した。エナメル芽細胞の分化マーカーであるAMB NはVD3 (100 nM) 添加群で, VD3添加後24時間, 72時間ともにコントロール群(DMSO添加群)と比較して細胞質での発現の増強が認められた(図3)。VD3添加群では24時間後からAMB Nの発現が認められ, 72時間後では更に発現が増強された。それに対してコントロール群では24時間後ではAMB Nの発現はほぼ認められず, 72時間後

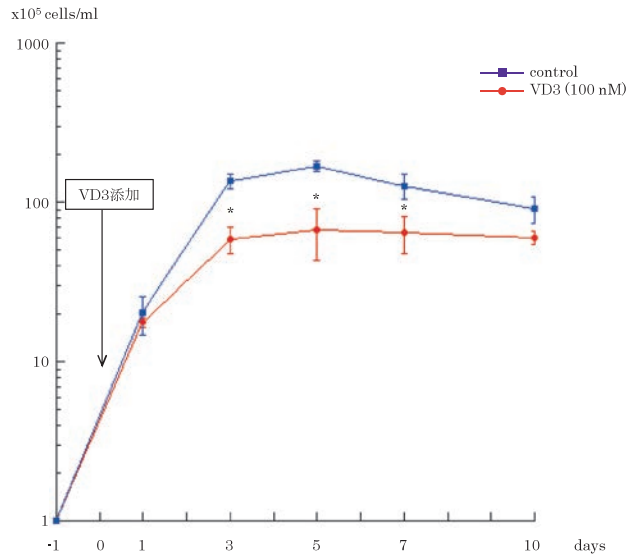


図1. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加による増殖能の経時的变化

VD3の増殖能への影響を調べるために, VD3 (100 nM)の存在下および非存在下でSF2細胞を1, 3, 5, 7および10日間培養し, 細胞数を比較した。コントロールにはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。細胞増殖はVD3添加群で3日目から抑制された。値は4~16回の実験の平均値±標準誤差を示す。

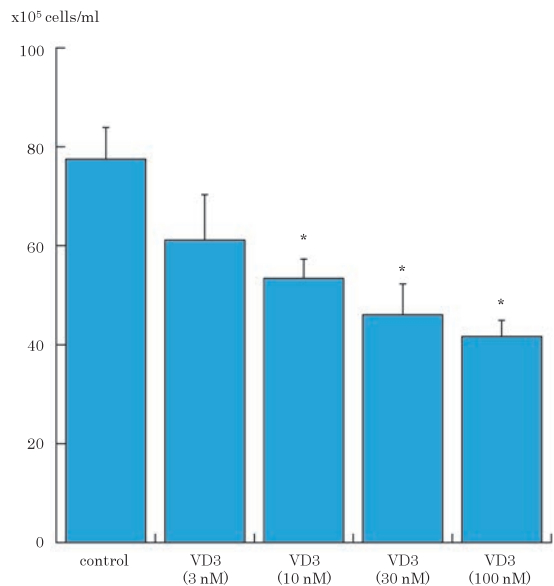


図2. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3濃度による増殖能の変化

SF2細胞にVD3を3, 10, 30および100 nM添加し, 3日間の培養後の細胞数を比較した。コントロールにはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。

細胞増殖はVD3濃度が10, 30および100 nMのとき抑制された。

値は4回の実験の平均値±標準誤差を示す。

で発現が認められた。

ギャップジャンクションの構成タンパク質であるCX43はVD3添加群で, 添加後24時間で発現の増強が認め

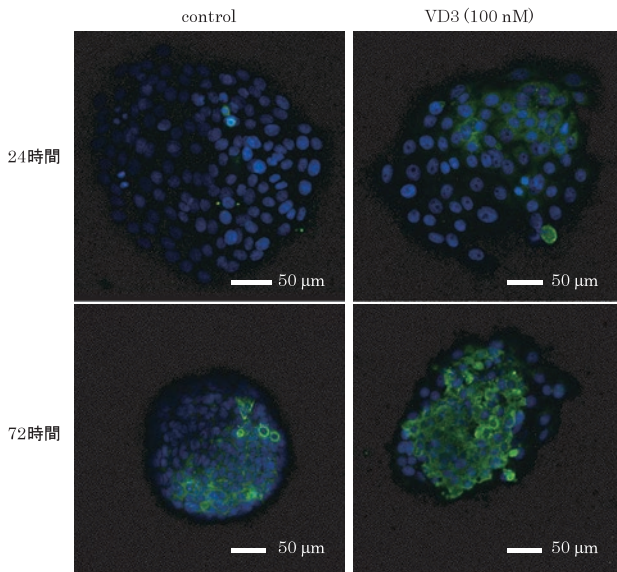


図3. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるアメロプラスチンの発現および局在の変化

細胞の分化程度を観察するために、VD3 (100 nM) 添加によるエナメルマトリックスタンパク (アメロプラスチン: AMBN) の発現を免疫蛍光組織化学染色で観察した。AMBNは緑、核はDapi (青) で染色した。AMBNはVD3添加後24時間後、72時間後ともにコントロールと比較して細胞質での発現が増強された。コントロールにはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。

られた。72時間ではコントロール群、VD3添加群ともに発現が認められたが、VD3添加群ではコントロールと比較して、細胞膜への局在が顕著であった。また、コントロールのCX43が細胞膜全体に均一に分布するのに対し、VD3添加群では斑状の強い蛍光として観察された (図4)。

3. VD3による石灰化への影響

VD3によるSF2細胞の石灰化誘導能を観察するために、アリザリンレッドS染色と、ALP assayをおこなった。アリザリンレッドS染色では、VD3添加群でCaCl₂濃度が2.8 mM以上のとき (CaCl₂ 1.0 mM以上添加時) に顕著な石灰化物の沈着がおこることが示された (図5)。さらに、ALP assayによってVD3による石灰化誘導能を定量的に解析した。生成されたp-ニトロフェノールはVD3添加群では0.7~0.8 mMなのに対して、コントロール群では約0.1~0.2 mMであり、ALP活性は、VD3添加群においてコントロール群と比較して3~8倍の顕著な増加が認められた。また、このALP活性の増加は、細胞外へのCaCl₂の添加を必要としなかった。これらのことから、VD3によるSF2細胞のALP活性の増加は細胞外へのCaCl₂の添加の影響を受けないことが明らかとなった (図6)。

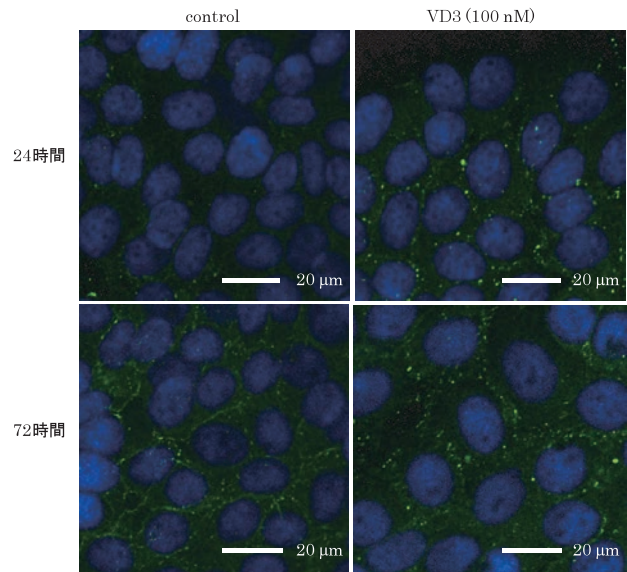


図4. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるギャップジャンクションタンパクの発現および局在の変化

細胞の分化程度を観察するために、VD3 (100 nM) 添加によるギャップジャンクション (コネキシン43: CX43) の発現を免疫蛍光組織化学染色で観察した。CX43は緑、核はDapi (青) で染色した。CX43はVD3添加後24時間で発現増強が認められた。72時間後ではコントロール、VD3添加群ともに発現が認められた。VD3添加群ではコントロールと比較して膜への局在が顕著であった。コントロールはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。

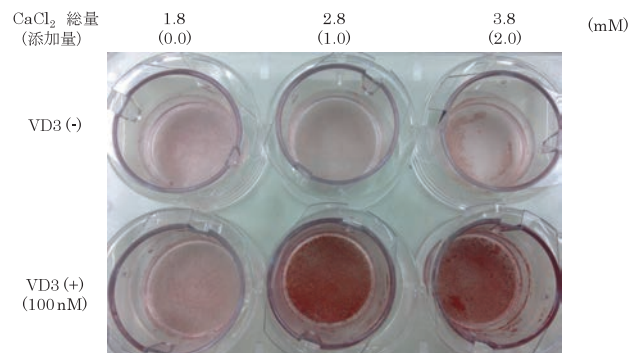


図5. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるアリザリンレッドS染色の変化

VD3による石灰化誘導能を観察するために、石灰化物の沈着をアリザリンレッドS染色で観察した。石灰化物の沈着はVD3と1.0 mM以上のCaCl₂添加群で顕著に認められた。

考 察

本研究ではSF2細胞をVD3存在下で培養すると、細胞増殖能の抑制、石灰化能の亢進、エナメル芽細胞の分化マーカーであるAMBNやCX43の発現上昇を起こすことが明らかになった。

VD3を添加すると、SF2細胞の増殖が添加後3日目から抑制されること、AMBNの発現がコントロール群と比較して早い段階から観察されたこと、CX43の膜への局在が早期に認められることから、VD3は分化を早め

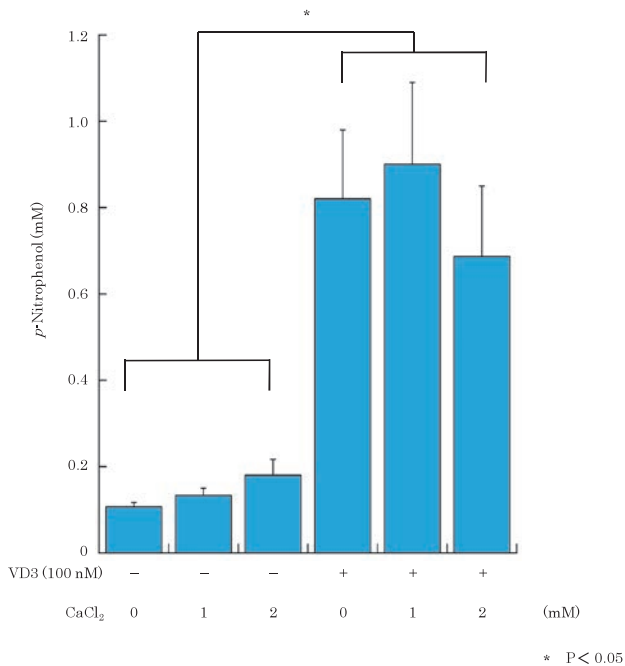


図6. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるALP活性の変化

VD3による石灰化誘導能を観察するために、ALP活性の変化を観察した。ALP活性はVD3添加群で顕著な増加が認められた。値は12回の実験の平均値±標準誤差を示す。

る作用があることが示唆された。AMBNは分化中のエナメル芽細胞で発現するエナメルマトリックスタンパクであり (Fincham, et al., 1999), 分泌期のエナメル芽細胞で多く分泌され、エナメル芽細胞の増殖を抑制して、分泌期のエナメル芽細胞の分化を維持する働きを担っていると考えられている (Sonoda, et al., 2009)。エナメル質形成においてAMBNは必要不可欠なタンパク質であり、AMBN欠損マウスではエナメル質形成不全が生じることが報告されている (Fukumoto, et al., 2004)。

CX43はギャップジャンクションを構成する主要なタンパク質であり、6量体になることによりコネクソンを構成する。隣接する細胞のコネクソン同士が連結することで、チャンネル機能を司るギャップジャンクションが形成される。ギャップジャンクションは、分子量1200以下の分子を通過させる通路であり、これらが多数集合して斑状のギャップ結合を形成し、セカンドメッセンジャーの交換など細胞間情報伝達が行われる。VD3の存在下で培養した細胞では、早期にCX43の発現が見られただけでなく、斑状の分布が顕著であったことから、VD3はギャップ結合の形成を促進すると考えられる。コネクシンは発生の初期から認められ、発生や分化過程への関与が推測されている。このCX43の欠損によりおこる眼歯指異形成症では、エナメル質形成不全をおこすことが報告されており (Jamsheer, et al., 2014), CX43欠損マウ

スではAMBNの形成が低下することが報告されている (Haku, et al., 2011, Toth, et al., 2010)。これらのことからVD3は、SF2細胞のエナメル芽細胞への分化を誘導し、エナメル質形成に関わるタンパク質を発現させたと考えられる。

SF2細胞に対するVD3の分化誘導能は、アリザリンレッドS染色およびALP assayによっても確認された。アリザリンレッドS染色による解析では、VD3による石灰化の亢進は1 mM以上添加時のCaCl₂存在下で認められた。この結果から、SF2細胞が石灰化能をもった細胞へと分化し、石灰化物の沈着が起こったことが明らかとなった。一方、ALP assayによる石灰化能の定量的解析では、VD3添加によるALP活性の上昇に細胞外へのCaCl₂の添加は影響しなかった。これらのことから高濃度の細胞外カルシウムはALPの誘導には必須ではないが、石灰化物の沈着には必要であると考えられる。ALPは分化中のエナメル器のエナメル芽細胞近位にある中間層の細胞で強く発現するといわれており、エナメル質の石灰化に重要な働きをもっている (Kawano, et al., 2002)。また、エナメル芽細胞同士はタイトジャンクションを形成して緊密に連結する。この細胞間に分泌された高濃度のエナメルマトリックスタンパクと細胞外Ca²⁺の反応によって石灰化が起こるとの報告がある (Hubbard, 2000)。アリザリンレッドS染色で検出された石灰化物の沈着は、このような過程を反映したものと考えられる。

VD3の存在により活性化する細胞内シグナル伝達経路には様々なものが報告されている (Gocek & Studzinski, 2009)。VD3はガン細胞の増殖を抑制するといわれており、例えばマウス基底細胞癌や、胎生期の横紋筋肉腫ではHedgehog経路の活性化により、分化を誘導することで増殖を抑制するとの報告がある (Larriba, et al., 2014, Uhmman, et al., 2011)。角化上皮細胞ではVDRとβ-cateninが相互作用により増殖と分化を制御しているとの報告もある (Hu, et al., 2014)。またWnt/β-cateninの発現上昇による骨形成誘導や (Larriba, et al., 2013)、Noch経路との共同による骨のリモデリングへの関与の可能性も報告されている (Shen & Christakos, 2005)。

本研究では、VD3が前エナメル芽細胞であるSF2細胞の分化を誘導し、エナメルマトリックスタンパクを多く分泌する細胞へと変化させるとともに、石灰化を誘導する作用をもつことが明らかになった。今後、VD3が活性化する様々なシグナル経路のうち、どの経路が関与しているかは検討が必要である。

結 論

VD₃は前エナメル芽細胞であるSF2細胞におけるAMBNやCX43の発現および石灰化能を上昇させ、前エナメル芽細胞からエナメル芽細胞への分化に関与することが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、前エナメル芽細胞を提供して下さった東北大学小児歯科福本敏教授に感謝を述べるとともに、本稿を終えるにあたり、御助言、御協力をいただきました同学歯学部口腔生物学系薬理学分野の諸先生に心より御礼申し上げます。

また、本研究には、北海道医療大学個体差健康科学研究プロジェクトの助成金の一部が利用された。

文 献

- Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y & Fukumoto S. Role of epithelial–stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem* 287 : R10590–R10601, 2012.
- Fincham A G, Moradian–Oldak J & Simmer J P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 126 : R270–R299, 1999.
- Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach P H, Nanci A, Kulkarni A B & Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167 : R973–R983, 2004.
- Gocek E & Studzinski G P. Vitamin D and differentiation in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46 : R190–R209, 2009.
- Haku K, Muramatsu T, Hara A, Kikuchi A, Hashimoto S, Inoue T & Shimono M. Epithelial cell rests of Malassez modulate cell proliferation, differentiation and apoptosis via gap junctional communication under mechanical stretching in vitro. *Bull Tokyo Dent Coll* 52 : R173–R182, 2011.
- Hu L, Bikle D D & Oda Y. Reciprocal role of vitamin D receptor on beta–catenin regulated keratinocyte proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144 Pt A : R237–R241, 2014.
- Hubbard M J. Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med* 11 : R437–R466, 2000.
- Jamsheer A, Sowinska–Seidler A, Socha M, Stembalska A, Kiraly–Borri C & Latos–Bielenska A. Three novel GJA1 missense substitutions resulting in oculo–dento–digital dysplasia (ODDD)–further extension of the mutational spectrum. *Gene* 539 : R157–R161, 2014.
- Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura N, Uchida T, Ohishi M, Toyoshima K & Harada H. Establishment of dental epithelial cell line (HAT–7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect Tissue Res* 43 : R409–R412, 2002.
- Kuhnisch J, Thiering E, Kratzsch J, Heinrich–Weltzien R, Hickel R & Heinrich J. Elevated serum 25(OH)–vitamin D levels are negatively correlated with molar–incisor hypomineralization. *J Dent Res* 94 : R381–R387, 2015.
- Larriba M J, Gonzalez–Sancho J M, Barbachano A, Niell N, Ferrer–Mayorga G & Munoz A. Vitamin D Is a Multi–level Repressor of Wnt/b–Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 5 : R1242–R1260, 2013.
- Larriba M J, González–Sancho J M, Bonilla F & Muñoz A. Interaction of vitamin D with membrane–based signaling pathways. *Frontiers in Physiology* 5, 2014.
- Shen Q & Christakos S. The vitamin D receptor, Runx2, and the Notch signaling pathway cooperate in the transcriptional regulation of osteopontin. *J Biol Chem* 280 : R40589–R40598, 2005.
- Sonoda A, Iwamoto T, Nakamura T, Fukumoto E, Yoshizaki K, Yamada A, Arakaki M, Harada H, Nonaka K, Nakamura S, Yamada Y & Fukumoto S. Critical role of heparin binding domains of ameloblastin for dental epithelium cell adhesion and ameloblastoma proliferation. *J Biol Chem* 284 : R27176–R27184, 2009.
- Toth K, Shao Q, Lorentz R & Laird D W. Decreased levels of Cx43 gap junctions result in ameloblast dysregulation and enamel hypoplasia in Gja1Jrt/+ mice. *J Cell Physiol* 223 : R601–R609, 2010.
- Uhmman A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Hess I, Nitzki F, Fritsch A, Pruffer N, Rosenberger A, Dullin C, Schraepfer A, Reifenberger J, Schweyer S, Pietsch T, Strutz F, Schulz–Schaeffer W & Hahn H. Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of hedgehog signaling and induction of vitamin D receptor signaling and differentiation. *Mol Cancer Ther* 10 : R2179–R2188, 2011.
- 山本浩貴, 山田龍男, 嶽北亜希, 有家巧, 正重裕一, 藤井隆史, 砂田典子, 本橋具和, 奥田勝也, 窪寛仁,

中嶋正博&覚道健治. 濾胞型エナメル上皮腫由来細胞
に対するレチノイン酸およびビタミンD3の影響. 歯
科医学 70 : R65-R71, 2007.



村田 佳織

平成16年3月 北海道滝川高等学校 卒業
平成17年4月 北海道医療大学歯学部歯学科 入学
平成23年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業
平成24年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学