

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22127006

研究課題名(和文)細胞のミクロな力学作用がマクロな心臓の形態を生み出すロジック

研究課題名(英文)A logical link between force-sensitive process in a micro scale and cardiogenesis in a macro level.

研究代表者

小椋 利彦(Ogura, Toshihiko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 124,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は拍動し、内部に正常な血液の流れが無いと正常に発生しない。事実、心拍に異常をもつゼブラフィッシュやマウスでは多彩な心奇形が生じ、ヒト先天性心疾患に類似した形態異常が見られる。これが遺伝子異常が無くても先天性心疾患が発症する原因のひとつと考えられている。拍動や血流に起因する機械的刺激が重要な意味を持つと考えられているが、その分子機構は未解明で、力と心臓発生を結びつけるロジックはわかっていない。本研究では、力刺激がどのように心臓発生、特に弁形成をコントロールするか、その詳細な分子基盤、遺伝子基盤を解き明かした。この研究は、先天性心疾患の理解に大きく役立つと予想される。

研究成果の概要(英文)：Heart does not develop normally without physical stimuli generated by heartbeat and circulation of blood. In fact, when heart contracts abnormally and/or blood circulates in a disturbed way, cardiac anomalies develop in both mouse and zebrafish. Onset of congenital heart diseases in human is believed to have the same mechanical background as other experimental model animals. Nonetheless, molecular mechanism by which cardiac cells sense physical forces generated contraction and blood flow is largely unknown. To establish a solid logical link between force and heart development, we performed this project and found key factors that play important roles during the force-sensitive process of cardiogenesis. More importantly, we revealed a molecular mechanism underlying the force-induced gene expression. As an unexpected results, we have found this force-sensitive process regulates other biological phenomena, such as metabolic homeostasis and regeneration/wound healing.

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：力刺激 転写調節 miRNA 心臓発生 弁形成

1. 研究開始当初の背景

心臓の発生は拍動を止めると正常に進まず、弁形成の不全など、ヒト先天性心疾患に似た奇形が生じる。これは、拍動が生む圧力や血流に起因するズリ応力などの物理的な「力」刺激が、心臓発生のプログラムに組み込まれていることを示している。また、初期発生における胚のダイナミックな変型(原腸陥入等)も、胚を構成する細胞の変形・移動・分裂が生み出す「力」が源になっており、「力」の問題を無視できない。しかしながら、心臓を含めた諸組織・器官内において、発生過程で「力」がどのようにして生まれるか、細胞がどのようにその「力」を受容し、どのような変化を起こすか、などの研究は進んでおらず、未踏の分野として残されている。

本研究は、このような学術背景から、「力」刺激がどのように心臓発生を制御するのか、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

2. 研究の目的

申請者は心臓発生をモデルに、「力」刺激の意義を明らかにすることにチャレンジしている。既に、心拍に依存して発現する遺伝子や miRNA、力刺激を受けると細胞質から核内へ移行する分子を複数同定している。また、心筋細胞の形、分裂頻度と方向などが心拍に依存して変化することも発見した。これは、心拍の物理的な「力」刺激が、心臓の形態に直接作用する可能性があることを示唆している。以上のデータは分子生物的手法で取得可能であったが、これに加え、「力」が「いつ」「どこで」「どのようにして」生みだされるかを知る必要がある。本申請研究では、これまでの知見に加え、発生中の心臓に生ずる「力」を測定する。そして最後に、それらを統合することで、「力」を含んだ心臓発生のプログラムの全容を明らかにすることを目的とした。この研究の成果は、心臓発生の理解にとどまらず、循環系の発生、恒常性の維持機構で働く制御ループを理解することにつながり、先天性心疾患の発症機序の理解、心不全の理解と治療法、心臓機能の再構築を行なう再生医療など、展開的応用にも発展する。また、心臓以外の器官形成の理解にも新たな視点を提示する。

3. 研究の方法

1) 心拍、血流に起因する力刺激の役割

心臓形成に必須の転写因子 Tbx5 の co-activator である MKL2 は心拍依存的に細胞質から核に移行して力依存的な遺伝子発現を調節するが、このシャトル現象を起こす力刺激の種類、メカニズムを探る。また、MKL2 の細胞内局在を決める因子、核内で相補作用

する因子を見つけるためにプロテオミクスで網羅的検索を行なう。力依存的に細胞内局在を変え、しかも弁形成に必須である新規因子についても同様の解析を行なう。また、力刺激依存的に発現誘導されるふたつの miRNA について、その発現調節領域を解析する。これまで同定した複数の力刺激感受性因子も心拍依存的発現を示すことから、そのプロモーターを解析する。力刺激依存的プロモーターを同定した後、ゼブラフィッシュ、マウスに GFP をつないで導入し、力刺激の可視化を行なう。また、心拍依存的な心筋細胞の分裂頻度、分裂方向、細胞形態を詳細にデータベース化し、同時に血流を測定することによって、循環器発生における心拍・血流動態、その変化を詳細に記述する。

2) 力刺激から見た心臓発生理解のための統合

前述したデータを心臓発生諸段階での循環動態シミュレーションへと展開し、また、力刺激の定量的可視化データと統合することによって、力刺激の視点で心臓発生を再記述し、統合的なロジックを見出す。

3) ロジックの普遍的展開

器官発生・組織発生の力学的基盤という普遍的なロジック樹立のために、プロテオミクス手法を用い、新規力感受性因子をさらに同定し、心臓発生に留まらない領域に発展させる。

4. 研究成果

1) Tbx5/MKL2 転写複合体の研究成果

これまでの実験から、Tbx5 の標的遺伝子 ANF (Atrial Natriuretic Factor) プロモーター上に、Tbx5 結合部位が複数、タンデムに並び、ここに Tbx5 が結合することが明らかとなっている。MKL2 は、細胞に力が加わってアクチンリモデリングが起こると細胞質から核内にシャトルし、Tbx5 と複合体を形成して ANF 遺伝子を強力に活性化する。

MKL2 は、別の転写因子 SRF (Serum Response Factor) とも複合体を形成することがわかっており、ANF プロモーター上には Tbx5 結合部位の近傍に SRF 結合配列が存在している。また、SRF 結合配列に酷似した A/T-rich motif も存在している。MKL2 が SRF を活性化して ANF 遺伝子の発現誘導を起す可能性を確かめるため、SRF 結合配列を in vitro mutagenesis で壊したが、Tbx5/MKL2 による転写活性化には変化がなかった。このことは、Tbx5 による ANF の力刺激依存的な発現には、SRF の関与が無いことを示している。

しかしながら、SRF 結合配列様 A/T-rich motif を壊すと、Tbx5/MKL2 による転写活性化は消失した。このことは、Tbx5/MKL2 による転写活性化には、A/T-rich motif に結合す

る転写因子が必須であることを意味している。

そこで、この A/T-rich-motif に結合する転写因子の探索を行った。まず、SRF、MEF の関与を確認したが、これらの因子の影響は皆無であった。転写因子データベースから、A/T-rich-motif に結合し得るものを抽出し、発現ベクターに組み込んで半網羅的に解析したが、ANF を Tbx5/MKL2 とともに転写活性化する因子の同定には至らなかった。さらに、データベース探索を拡大して検索し、いくつかの候補をピックアップして同様の実験を行った結果、Tbx5/MKL2 と協調的に働く因子をした。この転写因子は、Cut-homeodomain を持つ蛋白質で、核内では nuclear matrix と結合していることが知られている。

このようなアプローチに加え、A/T-rich-motif に結合する蛋白質を精製する実験も並行して行った。ビオチン化した A/T-rich-motif プローブを用いて核抽出液から結合を精製した所、約 85kDa の蛋白質の特異的なバンドを得た。前述の因子の分子量が計算上 85kDa であり、同じ因子を検出している可能性が高い。この因子はプロテオミクス解析によってその identity を解析中である。

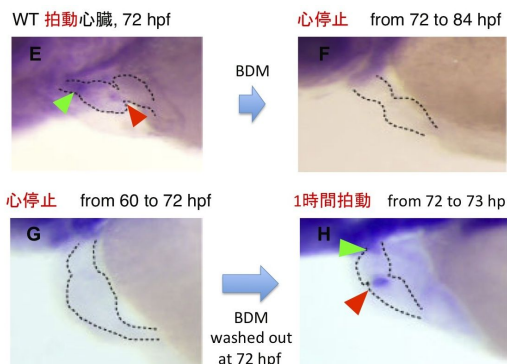
Tbx5/MKL2 複合体の全貌解明には至っていないが、この研究成果は力依存性転写活性化のメカニズムが予想以上に複雑で、核内マトリックスとの関連も出て来たことから、新しい視点で解析する必要があることを意味している。なお、この新規遺伝子のノックダウンなどの実験をゼブラフィッシュなどを用いて行っている。

2) miR-21 と弁形成

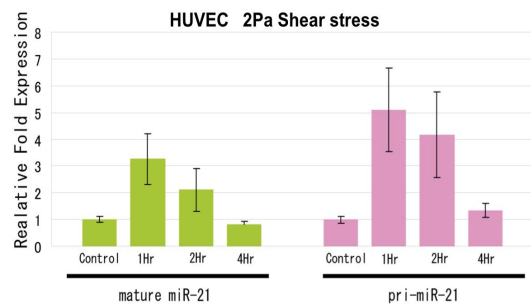
力刺激依存的に発現誘導される遺伝子（特に、血流に起因するずり応力によって血管内皮細胞に誘導される遺伝子）を検索して miRNA のひとつ miR-21 を同定した。

ゼブラフィッシュを用いて発現解析を行った所、miR-21 は、発生過程の心臓の弁形成心内膜細胞に局限して発現することが確認された。

BDM を用いて拍動を停止させると miR-21 の発現は消失し、その後、BDM を洗い流して拍動を再開させると、心拍開始最短で 15 分以内に miR-21 の発現は回復した（下図）。す

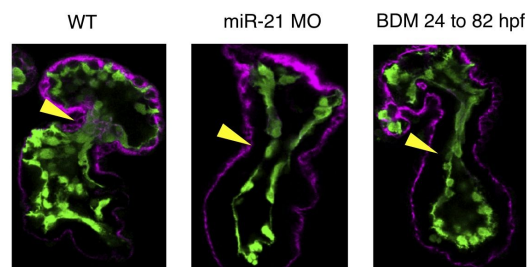


なわち、miR-21 の発現は、ほぼ完全に血流に依存していた。また、epinephrine を飼育水に混ぜて心拍数を上げ、血流を刺激した所、本来発現の見られない頭部大血管にも発現が誘導された。加えて、HUVEC にずる応力を印可した所、miR-21 の発現は強く誘導され、しかも両方向性の血流（正流と逆流の交互刺激）に顕著に反応することもわかった（下図）。



このことは、弁形成前には逆流が多く、弁形成が進んで逆流成分が減ると miR-21 の発現も弱まる事実と一致している。

弁形成時の miR-21 の標的遺伝子を探した結果、Sprouty2、Ptenb、pdcd4 など、細胞増殖に抑制的なものであった。このことは、血流によって miR-21 が発現すると、Sprouty2、Ptenb、pdcd4 の発現が抑制され、弁を形成する心内膜細胞の増殖を促進し、弁形成を正に制御していることを意味する。事実、miR-21 をモルフォリノオリゴによってノックダウンすると、弁形成部位の細胞増殖が抑制され、弁が全く出来ない表現型が得られた（下図）。



miR-21 の力刺激依存的な発現がどのように制御されているかを知る目的で、miR-21 プロモーターを同定して解析した。驚くべきことに、転写開始点の上流 200bp の短い領域は、ヒトとゼブラフィッシュで高度の保存されており、重要なモチーフが同定可能であった。そして、これらのモチーフには、前述した SRF 結合サイトが高度に保存された状態で見つかった。すなわち、弁形成前、心内膜細胞には、強い逆流刺激が加わっていて、これによって MKL2 が細胞質から核内にシャトルする。その結果、SRF/MKL2 複合体が形成されて miR-21 プロモーターを活性化する。

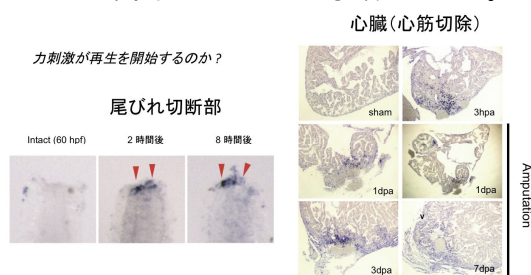
この可能性を確かめるため、約 200bp の短いプロモーター断片を EGFP 遺伝子に繋ぎ、トランスジェニックフィッシュを作製して EGFP 蛍光を確認した。園結果、EGFP は心内膜、心筋を含む心臓全体で発現することがわかった。そして、BDM を用いて心拍を止める

と EGFP の蛍光も消失した。BDM の除去による心拍再開では、EGFP の発現は速やかに回復した。以上の事実は、200bp の小さな領域に力反応性部位があり、その部位には SRF/MKL2 が結合する可能性があること、弁特異的な miR-21 の発現調節は200bp 以外の部分になることを結論できる。実際、miR-21 を含む大きな BAC クローンを用いると、EGFP はきれいに弁形成部位に限局し、血流依存性も再現できた。

3) miR-21 と組織再生

miR-21 の発現が力によること、miR-21 の発現によって細胞増殖は正に制御されることから、例えば、組織が外力によって損傷した場合、miR-21 の発現が誘導されて細胞増殖が促進されて創傷が治癒し、動物種によっては再生が起こることも考えられる。

ゼブラフィッシュでは、尾びれ先端の切除、心臓先端（心尖部）の外科的切除によって再生が起こる。この再生過程で miR-21 の関与があるかを検証した。その結果、尾びれ切除、心尖部切除の療場で、miR-21 の強い発現誘導が確認できた（下図）。このことは、ゼブラフィッシュの組織再生の過程で miR-21 の関与があることを示唆している。



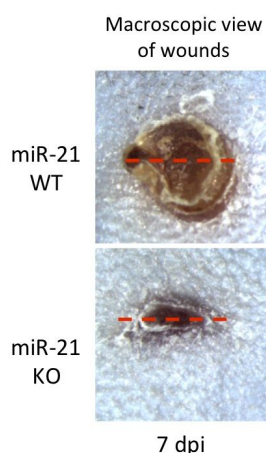
4) miR-21 ノックアウトマウスの解析

miR-21 の機能を、ゼブラフィッシュ以外の生物種で解析する目的でノックアウトマウスを作製した。残念ながら、miR-21 KO マウスは、正常に発生し、心臓形態、循環動態も正常であった。これは、miR-21 の機能には種による違いがあることを意味している。最も、ゼブラフィッシュとマウスの心臓では、大きさが全く異なっており、例えば、レイノルズ数は二桁違っていて、循環動態は大きく異なっている。しかし、培養細胞への力学刺激印加では、miR-21 の発現誘導が速やかに起こることを確認していたので、マウスでも力刺激への反応過程で miR-21 が何らかの意義をもっていることは予想された。

そこで、マウスの創傷治癒過程での miR-21 の機能解析を行った。

まず、マウス背部を剃毛して一定の大きさを皮膚をパンチアウトして欠損を作製した。そして、予想通り、皮膚欠損部位には miR-21 の発現が強く誘導されることを確認した。miR-21 KO マウスでは miR-21 の発現誘導は全く起こらない。

皮膚損傷後の治癒過程を観察した結果、



驚くべきことに、miR-21 KO マウスでは、皮膚損傷が極めて速やかに治癒することが確認できた（左図）。しかも、治癒した皮膚では繊維化が抑制され、皮膚は癒痕を形成せずにきれいに治癒した。これは、miR-21 の Antagomir が、外科手術や外傷、火傷などの外傷治癒を促進する薬剤として使える可能性を示唆する。

創傷治癒過程で、miR-21 がどのような標的遺伝子を制御しているか、詳細な探索を行おうとしたが、皮膚損傷部位からの mRNA の精製が充分に行えず、網羅的に検索するに至って居ない。

この研究は、未発表のままであり、標的遺伝子の同定を含め、今後、解析を拡大して論文として成果を発表するつもりである。また、できれば、損傷部位に miR-21 antagomir を投与する方法を確立し、miR-21 KO マウスと同程度の損傷治癒の促進が見られるかも検証したいと考えている。

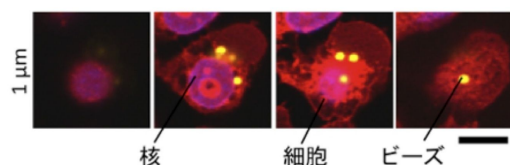
5) 細胞内を磁石化して力学刺激を細胞内で印加する方法の確立

これまでの研究は、培養細胞全体に伸展やずる応力を印加したり、組織を外科的に切除するという方法を用いて来た。しかし、細胞内の、例えばアクチン骨格に限定して、オルガネラレベルで力学操作する方法は見いだされていない。MKL2 がアクチン骨格のリモデリングに端を発して核内シャトルを起すこと、これまでに同定した力感受性蛋白質の多くが細胞骨格や接着斑に局在することなどを考えると、細胞内の特定の部位、特定のオルガネラを狙って限定的に力刺激を加える方法が必要になって来た。また、ずる応力を負荷されている細胞は、細胞質も、核も予想以上に大きく変形していることも観察した。これは、核、クロマチン、染色体テリトリーも力刺激によって変形し、遺伝子発現変化として反応する可能性を意味している。

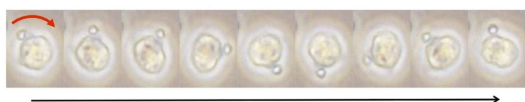
本研究では、細胞内にナノからミクロンサイズの微小鉄粒子を直接導入し、磁石に寄って動かす方法を確立すべく実験を行った。

幸い、liposome に詳しい工学系研究者の協力を得て、GUV (Giant Unilamellar Vesicle) liposome に鉄粒子等の物体と DNA 溶液を封入し、これを電気的に培養細胞に融合させ、GUV liposome 内の物体 / 物質を細胞内に移行させる方法を試行し、その技術を確立した。本方法では、細胞 / GUV 融合は一過的で、GUV 内部の物体 / 物質が細胞内に移行

した後すぐに両者は分離し、毒性を低く抑えることができた。従って、電氣的融合後の細胞死はほとんどない。また、導入された物体は、endocytosis と異なり、細胞質内に裸で存在し、膜で覆われていない。



本方法によって、電氣的条件とGUV組成の工夫によって、最大直径2ミクロンまでの鉄粒子を細胞内に直接入れることが可能となった(上図)。細胞質内に鉄粒子をもった細胞は、ネオジム磁石で容易に動かすことができる(下図)。また、本方法では、物体/物質導入に細胞種を選ばないため、ES/iPS細胞等、遺伝子導入の困難な細胞にも適応できることを確認した。また、鉄粒子以外にも、ミトコンドリアを移植することも可能となった。



本研究期間では実現できなかったが、鉄粒子表面を加工し、例えばアクチンタンパク、ヒストンタンパクなど、任意の蛋白質を付加することも可能である。そのような修飾鉄粒子を細胞内に導入してネオジム磁石で動かせば、アクチン骨格、クロマチンに力学刺激を限定的に印可することも可能と考えている。今後は、本方法を発展させ、オルガネラレベル、分子レベルでの選択的、限定的力刺激印加法の確立、ミトコンドリア移植などのオルガネラ操作など、全く新しい秘術開発に発展させたい。

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}(計12件)

1; Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 23, 6553-6566, 2014 査読有り

2; Saito AC, Ogura T, Fujiwara K, Murata S, Nomura SM. Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells: A Method for Cell-Giant Unilamellar Vesicle Electrofusion. *PLoS ONE* 9, e106853. doi: 10.1371/journal.pone.0106853, 2014 査読有

り

3; Huynen L, Suzuku T, Ogura T, Watanabe Y, Craig D, Millar CD, Hofreiter M, Smith C, Mirmoerini S, Lambert D. Reconstruction and in vivo analysis of the extinct *tbx5* gene from ancient wingless moa (Aves: Dinornithiformes). *BMC Evolutionary Biology*, 14, 75, 2014 査読有り

4; Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-Function Mutations in RIT1 Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 93, 173-180, 2013. 査読有り

5; Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, S. Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, Kawakami K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T. Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. *Nature Communications*, 4, Article number 1978, 2013 (doi:10.1038/ncomms2978). 査読有り

6; Watanabe Y, Zaffran S, Kuroiwa A, Higuchi H, Ogura T, Harvey RP, Kelly RG, Buckingham M. Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by *Tbx1*, *Nkx2-5*, and *Islet1* reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 18273-18280, 2012 査読有り

7; Hirota Y, Sawada M, Kida YS, Huang S, Yamada O, Sakaguchi M, Ogura T, Okano H, Sawamoto K. Roles of planar cell polarity signaling in maturation of neuronal precursor cells in the postnatal mouse olfactory bulb. *Stem Cells* 30, 1726-1733, 2012 査読有り

8; Shimizu M, Yawata S, Miyamoto K, Miyasaka K, Asano T, Yoshinobu T, Yawo H, Ogura T, Ishiguro A. Toward biorobotic systems with muscle cell actuators. *Proc. of AMAM2011*, 87-88, 2011. 査読有り

9; Miyasaka KY, Kida YS, Banjo T, Ueki Y, Nagayama K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T. Heartbeat regulates cardiogenesis by suppressing retinoic acid signaling via expression of *miR-143*. *Mechanism of Development* 128, 18-28, 2011 査読有り

10; Tanaka J, Harada H, Ito K, Ogura T, Nakamura H. Gene manipulation of chick embryos in vitro, EC culture, and long survival in transplanted eggs. *Dev Growth Differ* 52, 629-634, 2010. 査読有り

11; Ikeda M, Hirota Y, Sakaguchi M, Yamada O, Kida YS, Ogura T, Otsuka T, Okano H, Sawamoto K, Expression and proliferation-promoting role of Diversin in the neuronally committed precursor cells migrating in the adult mouse brain. Stem Cells 28, 2017-2026, 2010 査読有り

12 ; Hirota Y, Meunier A, Huang S, Shimozawa T, Yamada O, Kida YS, Inoue M, Ito T, Kato H, Sakaguchi M, Sunabori T, Nakaya M, Nonaka S, Ogura T, Higuchi H, Okano H, Spassky N, Sawamoto K. Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. Development 137, 3037-3046, 2010 査読有り

〔学会発表〕(計9件) 代表的なものを記載

1; 小椋利彦、Hemodynamic forces as a regulator of cardiogenesis and homeostasis、The 62nd NIBB Conference, 2014年11月17~19日、「岡崎コンファレンスセンター」(愛知県・岡崎市)

2: 小椋利彦、生命現象を力学的に再解釈する、そして、生命現象を再構築する???, 東京工業大学生体システム専攻バイオサイエンスシンポジウム、東京応業大学すずかけ台キャンパス、2014年2月18日、「東京工業大学」(神奈川県・横浜市)

3; 小椋利彦、生命現象を力を視点に再解釈するために、生物物理学会東北支部会、2013年12月13日、「東北大学片平キャンパス」(宮城県・仙台市)

4: 小椋利彦、細胞は力をどのように感知し、どのように反応するか、日本人類遺伝学会大8回大会特別講演、2013年11月21日、「仙台江陽グランドホテル」(宮城県・仙台市)

5; 小椋利彦、力を視点に、生命現象を再解釈する、第19回創発システムシンポジウム(創発夏の学校2013)チュートリアル講演&ワークショップ、2013年8月31日~9月2日、「大阪アカデミア」(大阪府・大阪市)

6; 小椋利彦、Physical forces as a regulator of morphogenesis and homeostasis – paving a way to medical application、第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2013年6月27日、「京都大学知芝蘭会館」(京都府・京都市)

7; 小椋利彦 Hemodynamics-dependent valvulogenesis of zebrafish heart mediated by miR-21. Exciting Biology 2012 (Force in Biology) 2012, 10, 4-10, 6 ダブリン(アイルランド)

8; 小椋利彦 Physical forces generated by cells and sensed by cells. 6th Mechanobiology Conference 2012, 11, 12~11, 14 シンガポール(シンガポール)

9; T.Banjo, M Omi, KY. Miyasaka, YS. Kida, T Ogura. Hemodynamics-dependent valvulogenesis of zebrafish heart mediated by miR-21. Weinstein Cardiovascular Development

Conference 2012, 5, 2~5, 4. シカゴ(米国)

〔図書〕(計2件)

1; 小椋利彦、日本臨床社、日本臨床 第73巻(第1号)、日本臨床 特集 多発性骨髄腫の病態と最新治療(基礎と臨床の最新情報)サリドマイド、cereblon と多発性骨髄腫、2015年(149-145頁)

2; [監修]小椋利彦、学研メディカル秀潤社、細胞工学 Vol 33、No. 9 特集 新メカノトランスダクション(工学との融合が明らかにする力学刺激センサーの動作とシグナル伝達)、2014年(910-1012頁)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞内へ物体を導入する方法
発明者: 斉藤明、野村慎一郎、小椋利彦
権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構
種類: 特許
番号: 特願2014-059898
出願年月日: 2014、3、24
国内外の別: PCT 出願準備中

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 利彦 (OGURA TOSHIHIKO)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 60273851

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: