

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K06925

研究課題名(和文)再生医療を目指した神経細胞分化制御における剪断応力の影響

研究課題名(英文) Regenerative-medicine oriented controlling of neuronal cell differentiation with shear stress

研究代表者

広井 賀子(Hiroi, Noriko)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：20548408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は再生医療を視野に入れた神経分化制御において、剪断応力を利用する手法の構築を目指し、マイクロファブリケーション技術で作成した培養器による研究を展開した。様々な剪断応力を加えることができる培養デバイスでは、剪断応力に依存して細胞の遊走能や形態、配向に影響が出ることを見いだした。また同様のマイクロ流路内での流体の性質を利用し、接着因子との組み合わせで細胞の一部のみを刺激因子を含んだ流体に曝露する手法の詳細を検討したり、拡散を組み合わせることで定量的に液性因子刺激を加えられる環境を作って細胞運命決定の最初のステップと考えられている分裂方向制御に必要な液性因子の濃度勾配を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

剪断応力の神経系の細胞に対する影響を多岐にわたり調査する上で効果的なツールを作成した。これにより、神経細胞が発生の過程で見せる振る舞いである、遊走、配向、神経細胞間ネットワーキングにおける剪断応力の影響を調べることが可能となった。同時に、細胞の一部という微小領域に限局的に刺激を与える方法として、本研究は実用的な手法の可能性を示している。また神経系に分化する培養細胞において、細胞運命決定における具体的な定量的な、単細胞スケールでの刺激因子の濃度勾配計測を行った例は本研究が初めてとなる。以上のように神経系を人為的に再構成して医療応用するための基礎的な知見を生み出した。

研究成果の概要(英文)：We developed cell culturing devices which can provide various shear stresses to cells. We found that shear stress changes the migration ability, morphologies and the orientation of cells. We also applied the characteristics of microfluidics in the devices for providing humoral stimuli only to a part of a cell instead of a whole cell, by the combination with extracellular matrix arrangement. We also developed a device which can control the concentration gradient of humoral stimuli. We got a biological finding with this device that there exist a quantitative threshold of concentration gradient for the decision of proliferation axis, which strongly connects with the cellular fate.

We developed these cell culturing devices to use shear stress to control neural differentiation for regenerative medicine. New effective medication for neuronal disease are desired by society and the needs will increase. We are planning to use our tools for more practical medication based on the above results.

研究分野：システム生物学, 定量生物学, 物理化学, 分子生物学

キーワード：再生医療 マイクロ流体デバイス 神経細胞分化 細胞遊走 細胞運命決定

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞を始めとする多分化能を有する細胞では、わずかな環境の違いで刺激に対する応答にばらつきが生じやすいことが経験的に知られている。例えば、神経系の細胞に分化誘導可能な細胞株を流れのストレス下で培養すると、分化誘導刺激に対して応答する細胞の割合が増えたり、分化に伴って見られる形態変化が助長されたりすることが知られている。一方生体内では、脳ではその水分状態を保つために、1日に450～600mlの脳脊髄液が生産、分泌、再吸収されており、そのためくも膜下では概算で6.94 [μl/sec]の髄液の流れに組織が曝されている事になる。大部分は脈絡叢で産生・分泌され、上矢状静脈洞のクモ膜顆粒より静脈血中に吸収されることを考えると、一部の毛細血管を介した吸収で作られる流れのみに個々の神経細胞は暴露されていると考えられ、これは上記の概算より小さいものと想像出来るが、上記のような流速は、層流が保たれるようなマイクロ流体デバイス内の環境に比べ100倍もの値であり、過去の研究事例と照らした時、脳内の細胞分化に大きな影響を与える可能性が考えられる。しかし、このような神経分化への流れの影響を厳密に定量的に解析した事例は数少なく、神経細胞のような繊細な分化制御を必要とする系では、詳細な研究が待たれる。提案者はこれまで神経系に分化誘導可能な細胞をマイクロ流体デバイス内で培養した経験を活かし[1]、神経細胞分化制御機構への流れ刺激の影響を定量的に調べるためのツール開発を行い、これを用いて、神経細胞分化制御機構の解明、および制御方法の開発に貢献することを目指す。

[1] Hiraiwa T, et al. 2014 IEEE 27th International Conference on MEMS. 2014, p264-267

2. 研究の目的

人体をはじめとする生体内の細胞は、各組織の水分量を調整するための水分と、その分泌・排出機構との間で生じる「流れ」に曝されている。本研究は、従来の細胞培養環境とは異なり、流れがある環境での細胞培養環境を用意し、細胞増殖・分化機構への流れの影響を調べることを目的とする。マイクロファブリケーション技術を用いることで、細胞の配置、培養液の流速や液性刺激を変化させる。特に分化・増殖の繊細な制御が必要となる神経系の細胞に着目して、流れのある環境で培養された細胞が、静置されている場合とどのように分子レベル、細胞レベル、細胞集団レベルで異なる振る舞いをするかを調査する。

[対象とする生物学的ターゲット]

1) **運命決定プロセスへの影響**: 神経系の細胞に分化誘導可能な細胞株(SK-N-SH またはその一部のクローン)、または神経幹細胞を用いて、生体内を模した、流れのある培養環境を用意した場合、流れのない場合に比べて分化する細胞、分化しない細胞の位置選択、すなわち運命決定プロセスに影響があるか調べる。

2) **移動能への影響**: 運命決定後の神経細胞は次に組織内の適切な部位へ移動する。そこで流れの中にある細胞の移動能を調べ、流れがない環境で培養した細胞の移動能と差があるか調べる。

3) **形態的特徴への影響**: 神経細胞に分化した場合に現れる形態的な特徴(ニューライトの長さ等)について、流れがある環境で培養した場合に定量的値に計測可能な影響があるかを明らかにする。

4) **高次機能への影響**: 形態形成への影響に基づくと、神経が司る高次機能(信号伝達など)にどの程度の影響があると考えられるか見積もる。

3. 研究の方法

<1>細胞培養デバイスの作成

[1] マイクロコンタクトプリンティング

1) ソフトリソグラフィによるスタンプ作成

2) 細胞接着因子の選定と扱い方

神経細胞に分化誘導可能な培養細胞株(SK-N-SH, SH-SY-5Y, IMR-32)に対して、コラーゲン、ラミニン、poly-L-リジンなどの接着因子との組み合わせを用意し、培地が流速を持つ条件下で確実性高く接着培養でき、分化誘導出来る組み合わせを検討する。

[2] マイクロ流体デバイスの作成

(1) 安定して流速を変化させながら細胞培養可能な培養槽

培養槽には、細胞を配列して流れによる刺激が制御出来るようデザインにする。

今回、培地を取り入れる側が二股に分かれた流路を持った培養槽を作成し、培養槽内で層流を保つのに必要な条件を検討する。

(2) マイクロコンタクトプリンティングで作成したパターンを壊さずにガラス基板に培養槽を接着するための仕掛け

Y字の培養用流路の外側に、陰圧による圧着を実現するための大きな空洞を用意する。バキュームポンプ内部を陰圧に保ち、培養用のガラス基板に圧着する。

この際生じることが予想される問題点について検討する。

-1)漏れの確認及び基盤破損の確認

-2)細胞障害の確認

[3] 流れ刺激培養

(1) 配列細胞への流れによる刺激の確認: 細胞を培養しながら定量的に流速を変化させ、差異が観察されるか検討する。

(2) 細胞形態変化の観察: 画像データを数多く取得し、統計的に価値のあるサンプル数で後に行うマーカー発現パターンとの比較を半定量的に行う。

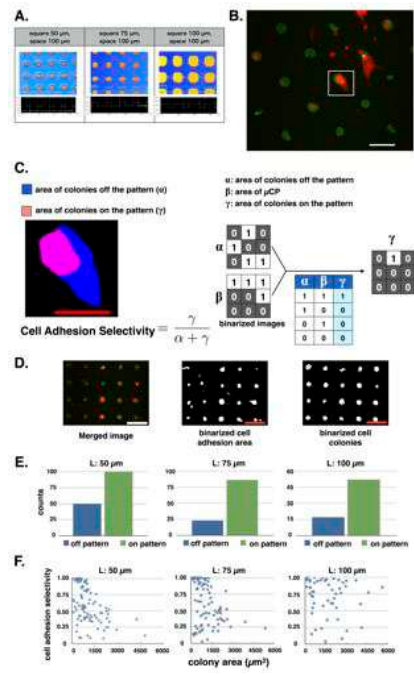
細胞の形態変化を起こさせる刺激を細胞の局所に加えた際に、形態変化に伴うシナプス小胞の移動、極性分子および細胞骨格結合タンパク質の分布変化等を観察する。

4. 研究成果

1. マイクロコンタクトプリンティングの条件検討

PDMS を用いて底面積-高さ比を変更したスタンプを作成し、ラミネンをプリントした基盤に対する細胞の off pattern/on pattern 率を計算した。その結果プリントサイズには最適値があることが示唆された。

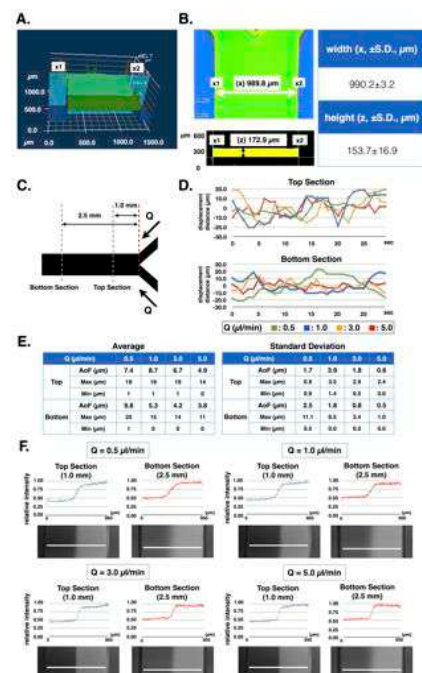
図1: A. マイクロコンタクトプリンティング用のPDMSの表面構造。 B. プリントしたラミネン(緑)に対し、細胞(赤)を播種した様子 (bar=100µm), C. off pattern/on pattern の計算方の説明, D. 計算時の画像処理結果, E. パターンサイズごとの off pattern(青)/on pattern(緑)率。



2 マイクロ流体デバイスの開発

本研究では、計画当初に予定していた Y 字流路を基本とする細胞部分刺激を可能にするデバイスの他、拡散を利用して細胞に対する刺激の定量的な勾配を作り出すデバイス、および、大きさの異なる剪断応力を 1 つの実験の中

で同時に作り出すデバイスの 3 種類を主に使用した。



[1] Y 字流路デバイス

このデバイスを用いて、マイクロ流体の性質を利用し、流れの存在下で培養されている細胞の一部分だけを液性刺激因子に暴露するための詳細な条件検討を行った。マイクロコンタクトプリンティングの技術、その他デバイスを利用した自動培養環境構築のための各技術に関する報告とともに、現在投稿準備中である。

図2: A. 作成した流路の断面, B. 2D 構造, C. 全体設計, D 流速を変えた場合の 2 つの流れの接面の位置変動(最上面(上)と底面(下)), E. その平均値と標準偏差, F. 異なる流速ごとの具体的な最上面と底面の像および流体に含まれている蛍光物質の相対的輝度値。底面では速い流速を与えた場合、界面位置を制御しやすいことがわかった。

[2] 拡散利用デバイス

このデバイスは多くのマイクログローブを細胞培養 well に付属させ、左右で流す培地の成分の勾配が、計算予測値によく fit するような培養環境を作り出した。アプリケーションとして、生物学的な解析ターゲットである **1) 運命決定プロセスへの影響** について特に検討した。

正しい方向への分裂は正常な発生過程において非常に重要である。そのため、生体内における細胞分裂方向が何によって決定されているか明らかにすることを目的とした研究が多数行われてきた。中でも、細胞分裂の異方性は液性因子の不均一な空間分布によって制御されているという証拠が多く見つかっている。本研究では、その様な作用を持つ液性因子として Wnt タンパク質に着目した。Wnt タンパク質は、昆虫から脊椎動物までの多細胞真核生物で保存されているタンパク質である。Wnt タンパク質は組織形成に関与するだけでなく、細胞周期や分化の制御も行う、生体にとって重要なタンパク質である。本研究では Wnt タンパク質として、Wnt3a を用いた。

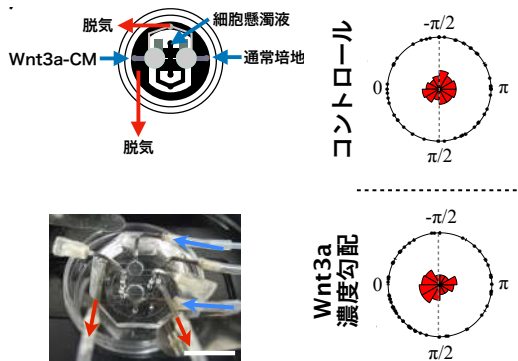


図 3: 作成したデバイスの概要(左上段図および右下段写真). 中央の黒線部分で細胞を培養する. 左右で Wnt3a 含有培地または不含有培地を流すことにより、細胞培養部では一定の Wnt3a の濃度勾配環境が実現する。濃度勾配がある中で培養すると、特定の細胞周期上にある細胞の分裂方向に偏りが現れた(右ローズダイアグラム). Bar は 1 cm.

Wnt3a タンパク質の濃度勾配を形成するためのマイクロ流体デバイスを作成し、分裂時における異方性決定に必要な濃度差を求めた。その結果、 10^{-1} nM 程度の僅かな濃度差で、分裂時の異方性が決定されていることを明らかにした。この成果は、Hiraiwa, T. et al. *FEBS Open Bio*. 2018 Nov 9;8(12):1920-1935. で発表した。

[3] 剪断応力テストデバイス

本研究提案の要となる剪断応力を様々な大きさで加えてその影響をテストするためのデバイスは、**プロトタイプ**と**応用実機**の 2 型を作成し、それぞれ生物学的な解析ターゲットのうち、**3) 形態的特徴への影響** (神経細胞に分化した場合に現れる形態的な特徴(ニューライトの長さ等)について、流れがある環境で培養した場合に定量的値に計測可能な影響があるかを明らかにする)を**プロトタイプ**で、**2) 移動能への影響** (運命決定後の神経細胞は次に組織内の適切な部位へ移動する。そこで流れの中にある細胞の移動能を調べ、流れがない環境で培養した細胞の移動能と差があるか調べる)、および **4) 高次機能への影響** (形態形成への影響に基づく、神経が司る高次機能(信号伝達など)にどの程度の影響があると考えられるか見積もる)を**応用実機**で検討した。

1) プロトタイプにおける神経系細胞への分化能を持つ細胞の形態的特徴への影響の検討

図 4 に示すようなデバイスを作成し、Particle Image Velocimetry(PIV)法によって設計通りの剪断応力を細胞に与えられる環境となっているか検討後、流路内で SH-SY-5Y の培養を行った。

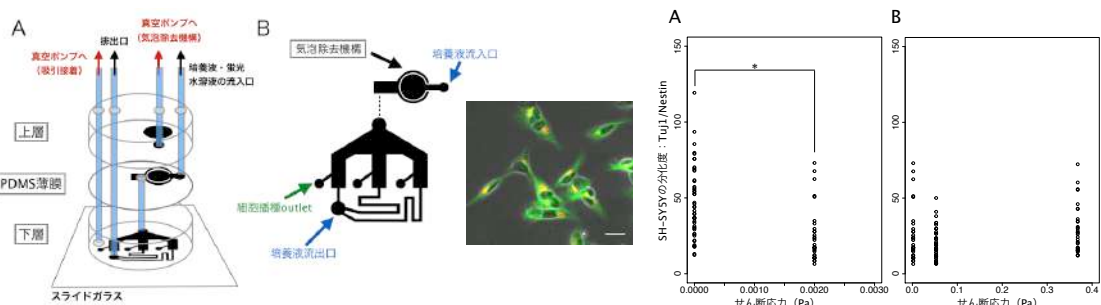


図 4. プロトタイプの構造概要(左). 異なる剪断応力を与えることができる 3 つの流路を持つ。培養部の後ろに作られた抵抗構造の断面積と長さに応じて流速が変化し、与えられる剪断応力が変化する。中央写真は SH-SY-5Y, Tuj1(緑), Nestin(赤). Bar は 50 μ m. 右グラフ A. 静置培養と 0.002Pa 下培養の比較. B. 0.002 ~ 0.368 Pa の範囲の比較.

流路内の剪断応力はオーダーのレベルで予測値と計測値が一致した。この環境で培養した結果から、静置培養と比較した場合、流れがあると神経突起の伸長が抑えられる一方、剪断応力 0.002 ~ 0.368 Pa の範囲では、剪断応力が大きくなればなるほど神経突起の伸長が見られ、同時に分化マーカーの発現がタンパク質レベルで上昇することが示された。この結果から、神経細胞様の分化を起こす細胞において剪断応力の影響には、分化を促進する要素と阻害する要素があり、強さによって細胞への影響の現れ方が変化することが示された。神経細胞系の細胞分化制御に剪断応力を応用する場合、定量的に適切な範囲を定めて利用する必要があることが示唆された(投稿準備中)。

2) 応用実機による神経系細胞の移動能への影響の検討および形態変化への影響の検討

応用実機ではプロトタイプデバイスを改良し、4つの大きさの異なる剪断応力を加えることのできるデバイスとして作成した(図6)。

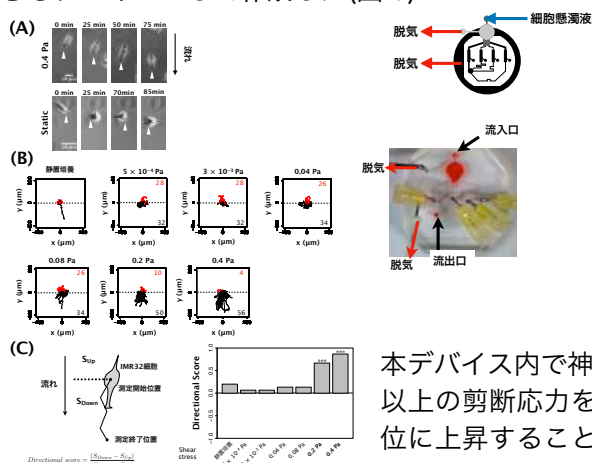


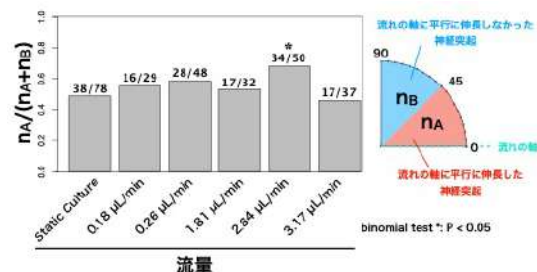
図6. 応用実機の構造概要(右上図および右下写真). 左図(A)0.4Paの剪断応力を加えた場合(上段)と静置培養(下段)の場合の比較(bar=20μm). (B)それぞれの剪断応力下での遊走の軌跡. 赤は流れに逆らった軌跡, 黒は流れと同方向の軌跡. (C) 細胞遊走軌跡の Directional Score 計算法(左)と数値化したもの(右).

本デバイス内で神経芽細胞腫 IMR32 を培養したところ、0.4Pa以上の剪断応力を加えると、流れに沿った細胞遊走の頻度が優位に上昇することが示された。これが剪断応力の影響によるものか、静圧の影響によるものか区別するため、別に培養液の粘度を変えた場合の実験、および培養環境内の静圧の測定を行い、剪断応力の影響であることを確認した。また、細胞自身の生理的な変化を伴った現象であることを確認するため、細胞内カルシウムシグナルの剪断応力刺激下の変化を見たところ、刺激に依存して上昇していたことから、細胞が剪断応力刺激を受けて細胞内に伝達していることを確認した。さらに、足場依存タンパク質の接着面形状の変化を計測し、その分布や接着斑形状に変化が生じること、またこれらの積極的な変化が、MYCN の過剰発現によることを突き止めた。この成果は Hiraiwa, T. et al *Journal of the Royal Society Interface*, 16(152), [20180934]. で発表した。

3) 応用実機による高次機能(細胞間インタラクションなど)への影響の検討

同実機を用いて SH-SY5Y の細胞集団における、分化誘導時の神経突起伸長方向と流れの関係について検討した。流れの軸に平行に伸長した神経突起と、平行に伸長しなかった神経突起について、統計解析(二項検定)を行ったところ、特定の流量下では静置培養の場合に比べ、流れに平行に伸長する突起が有意に多かった。これらの突起の前細胞・後細胞の向きを、軸索内のチューブリン結合タンパク質の移動軌跡から定義して、機能的な前後と流れの方向に関連があるか解析したところ、差が見られなかった(投稿準備中)。

図7. 流れに沿って神経突起伸長が起きるか二項検定で解析したところ、特定の流速の場合のみその傾向が見られた。



[結言] 計画立案当初に比較し、様々な構造の細胞培養用マイクロ流体デバイスを作成し、神経細胞分化への剪断応力の影響を、細胞運命決定プロセス、移動能、形態変化、高次機能の各項目について、分子レベル、細胞レベル、細胞集団レベルで検討した。剪断応力は神経分化において、形態変化と遊走能に一定の傾向を作り出す作用があるが、信号伝達の方法にまで明確な配向を起こす作用は確認されなかった。また本研究を通して、マイクロ流体の様々な性質を応用すると、分裂方向制御や形態変化、遊走の傾向、分化誘導シグナル発生頻度などの制御に利用できる可能性を示せた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiraiwa Takumi, Nakai Yuichiro, Yamada Takahiro G., Tanimoto Ryuichi, Kimura Hiroshi, Matsumoto Yoshinori, Miki Norihisa, Hiroi Noriko, Funahashi Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Quantitative analysis of sensitivity to a Wnt3a gradient in determination of the pole-to-pole axis of mitotic cells by using a microfluidic device	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1920 ~ 1935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Hiraiwa, Takahiro G. Yamada, Norihisa Miki, Akira Funahashi and Noriko Hiroi	4. 巻 16
2. 論文標題 Activation of cell migration via morphological changes in focal adhesions depends on shear stress in MYCN-amplified neuroblastoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. R. Soc. Interface	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki Tsuyoshi, Takiguchi Ryo, Hiraiwa Takumi, Yamada Takahiro G., Yamazaki Kazuto, Hiroi Noriko F., Funahashi Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Neural Differentiation Dynamics Controlled by Multiple Feedback Loops in a Comprehensive Molecular Interaction Network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 1 ~ 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3390/pr8020166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Noriko Hiroi	
2. 発表標題 Quantitative analysis of sensitivity to Wnt3a gradient in determination of the pole-to-pole axis of mitotic cells by using a microfluidic device.	
3. 学会等名 Keio University International Symposium on Advanced Technologies for Mechano-biology and Regenerative Medicine. (招待講演) (国際学会)	
4. 発表年 2018年	

1. 発表者名 東恩納麻州
2. 発表標題 Quantification of the effect of shear stress on the differentiation of SH-SY5Y cells.
3. 学会等名 Interantional Workshop on Quantitative Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平岩巧
2. 発表標題 High sensitivity to Wnt3a gradient in localization of ODF2/cenexin of neuroblastoma cell in mitosis.
3. 学会等名 Interantional Workshop on Quantitative Biology 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 広井賀子
2. 発表標題 Asymmetric division, cell migration, and differentiation control in microfluidic devices.
3. 学会等名 Emerging Research Challenges in Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東恩納 麻州
2. 発表標題 QUANTIFICATION OF THE EFFECT OF SHEAR STRESS ON THE DIFFERENTIATION OF SH-SY5Y CELLS
3. 学会等名 International Symposium on Micro-Nano Science and Technology 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 広井 賀子
2. 発表標題 非対称分裂 - 定量で明らかになる組織形成の始まり -
3. 学会等名 医薬工コモンズシンポジウム 第12回インキュベーションラウンジ (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takumi Hiraiwa
2. 発表標題 Development of Method for Asymmetric Cell Division Analysis using Microfluidic Device
3. 学会等名 Japan Q-Bio week, Tokyo Symposium (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中村 善次
2. 発表標題 神経分化過程における流れの寄与の解析
3. 学会等名 CeLLab-SOCU Summer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 善次
2. 発表標題 神経分化過程における流れの寄与の解析
3. 学会等名 定量生物学の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Hiroi
2. 発表標題 Microfluidics Application in Quantitative biology for revealing the origin of multicellular organisms.
3. 学会等名 2019 centuri conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 広井 賀子
2. 発表標題 「流れ」が変える細胞と細胞集団の振る舞い
3. 学会等名 2019 理論と実験
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	舟橋 啓 (Funahashi Akirat) (70324548)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授 (32612)	研究代表者とともに課題ごとの研究デザインと研究協力者への指導的助言、研究設備保守および数理モデル構築、解析に貢献。
研究 協力者	平岩 巧 (Hiraiwa Takumi)		博士課程学生として全ての項目における実験およびツール開発、他の研究協力者への助言に貢献。
研究 協力者	中村 善次 (Nakamura Yoshitugu)		修士課程の学生として、剪断応力テスト用実機デバイスにて主に神経細胞集団の形態変化および高次機能への剪断応力の寄与を調査する実験に貢献。

6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	東恩納 麻州 (Higashionna Matthew)		学士学生として、剪断応力テスト用プロトタイプデバイスにて主に神経細胞分化過程の形態変化に対する剪断応力の寄与を調査する実験に貢献。
研究協力者	岩崎 剛之 (Iwasaki Tsuyoshi)		博士課程学生として神経細胞分化過程制御の数理モデル構築による分化制御法示唆に貢献。
研究協力者	山崎 一人 (Yamazaki Kazuto)		博士課程研究協力者への指導的助言、及び神経細胞分化過程制御の数理モデル構築による分化制御法探索の研究計画及び実施へ貢献。
連携研究者	山田 貴大 (Yamada Takahiro) (20837736)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教 (32612)	舟橋 啓分担研究者の研究室助教として、研究全般の統計的データ解析に貢献。
連携研究者	三木 則尚 (Miki Norihisa) (70383982)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授 (32612)	本研究全般にわたって必要な実験機器使用法及び実験手技の指導、方針への助言に貢献。
連携研究者	松本 佳宣 (Matsumoto Yoshinori) (60252318)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授 (32612)	本研究で必要となった実験機器使用法及び実験手技の指導に貢献。
連携研究者	木村 啓志 (Kimura Hiroshi) (40533625)	東海大学・工学部・准教授 (32644)	博士課程研究協力者への指導的助言、及び一部作成困難なツール開発及び作成に貢献。
連携研究者	太田 裕貴 (Ota Hiroki) (30528435)	横浜国立大学・工学研究院・准教授 (12701)	連携研究者三木則尚教授の下、不可欠の実験手技の指導に貢献。

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	田口 良広 (Taguchi Yoshihiro) (30433741)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授 (32612)	博士課程研究協力者への指導的助言, 及び一部作成 困難なツール作成の指導に貢献.
連携研究者	岡 浩太郎 (Oka Kotaro) (10276412)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授 (32612)	研究立案初期段階で研究代表者及び研究分担者への 助言, 提案, 各研究協力者の研究遂行過程への指導 的助言に貢献.