

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14371

研究課題名(和文)採卵・顕微注入・移植を要しない、新しい遺伝子改変マウス作製法の開発と応用

研究課題名(英文)Development of novel method for generation of genome editing mice without ex vivo handling of embryos

研究代表者

大塚 正人(OHTSUKA, Masato)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90372945

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 従来のゲノム編集マウス作製法では、(1)受精卵の回収、(2)CRISPR関連試薬の顕微注入、(3)注入卵の偽妊娠マウスへの移植、という熟練した技術と高価な設備を要する3つのステップが必須であった。今回、受精卵を有する妊娠メス卵管へのCRISPR関連試薬の注入、続く卵管全体へのin vivo電気穿孔を行うことで、上述した3つのステップ全てを省いてゲノム編集マウスが作製できる新手法「GONAD」の開発とその応用を進めた。

研究成果の概要(英文): Animal transgenesis involves three major technical steps; isolation of fertilized eggs, microinjection and subsequent transfer of eggs into recipient females, which require sophisticated equipment as well as highly skilled personnel to perform the task. Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD) method developed in this study is a novel technique enabling genome editing in mice through intraoviductal instillation of genome editing components followed by an in vivo electroporation. Since the GONAD does not require ex vivo manipulation of zygotes, it is possible to produce genome-edited mice even by the researchers who do not possess special skills for ex vivo handling and micromanipulation of embryos.

研究分野：遺伝子工学、発生工学

キーワード：ゲノム編集 マウス CRISPR エレクトロポレーション in vivo GONAD

1. 研究開始当初の背景

トランスジェニック (Tg) マウスやノックアウト (KO) マウス等の遺伝子改変マウスは、個体レベルでの医学生物学的解析に幅広く使用されている。CRISPR 系を含むゲノム編集法が開発された現在、受精卵へ核酸溶液を直接注入する「顕微注入法」を介してこれらの遺伝子改変マウスを作製することが一般的である。顕微注入法は、1細胞期受精卵の回収(採卵)、受精卵への核酸溶液の顕微注入、偽妊娠マウス卵管への移植、の各手順を進めることになるが、採卵、顕微注入、移植には熟練した技術が必要となること、また顕微注入用の機器は高価であることなどから、誰もが容易に実施できる環境にある訳ではない。従って、国内外を問わず研究者の多くは外部企業か所属研究所内の動物施設に作製を依頼するが、この場合、多大なコストを要する、手技に精通した技術者不足、等の問題があることも多い。

我々は、受精卵を有する卵管に核酸を注入して電気穿孔(エレクトロポレーション)を実施することにより、採卵、顕微注入、移植の手順を介さず、遺伝子改変マウスが作製可能であるのではと考えた。そのアイデアをもとに、連携研究者の佐藤らは、卵管内に存在する2細胞期胚にDNAを導入し、着床前胚で目的遺伝子を発現させることに成功している(GTOVE法; Sato et al. Syst Biol Reprod Med 2012: 後に Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery [GONAD]法と改名)。GONAD法は顕微注入法と比較して少ない手順で終了し、且つ技術的にも容易であり、要する機器の価格も安い。

2. 研究の目的

本研究では、高度な技術と高価な機器を要せず、多くの研究者が簡便且つ容易に実施でき、更に動物愛護の点でも優れた新しい遺伝子改変マウス作製技術(GONAD法)の開発を目指す。具体的には、受精卵を有する卵管への核酸溶液(ゲノム編集試薬)の注入と、その後の電気穿孔法の実施によってゲノム編集マウスを作製する手法の確立を行う(図1)。また、実際に当該技術を白内障モデル

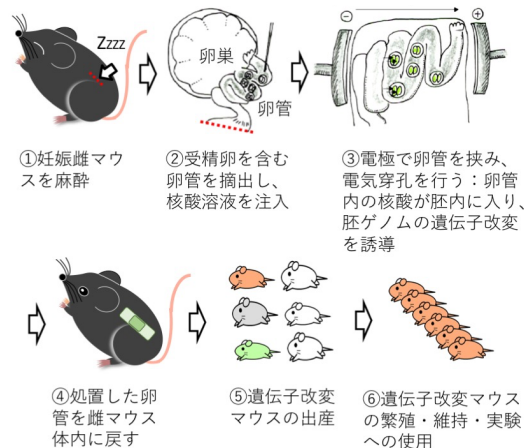


図1: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (GONAD)法

マウス作製に応用する。

3. 研究の方法

本計画では、a) GONAD法の確立・最適化と標準プロトコル作成、b) それを用いた遺伝子改変マウス作製、c) 白内障関連遺伝子モデルマウス作製と解析、を進める。a, bについては、申請者が確立してきた手順・方法をベースに、連携研究者(佐藤)や学外専門家の意見を伺いつつ学内協力者と共に進め、cに関しては分担研究者(和田)と定期的に連絡を取りつつ共同研究として進める。特に GONAD法の確立と応用に重点を置く。

4. 研究成果

<研究の主な成果>

・GONAD法の確立と応用

まず最初に、妊娠雌マウスの卵管に eGFP RNA を注入し、エレクトロポレーション処理する(GONAD法)ことにより、卵管内に存在する2細胞期胚にRNAを導入してゲノム編集を行うことが可能であることを示した。しかしながら、この時点では着床前胚の結果のみしか得られていなかったため、さらにゲノム編集着床後胚、およびマウス個体を得ることを目指した。2細胞期胚である1.5日胚の受精卵(交配シプラグが確認された次の日)を含む卵管に Cas9 と sgRNA(白内障原因遺伝子である *Foxe3* に対するもの)を RNA として導入し、エレクトロポレーションを施した。これは0.5日胚の受精卵は卵丘細胞に覆われており、核酸が受精卵に到達するための物理的障害となるためである。しかしながら遺伝子破壊マウス個体を得ることが困難であったため、次に、卵管内の受精卵の位置が卵管膨大部近傍に限局されていると思われるが、既に卵丘細胞との接着が緩んできていると考えられる0.7日胚(交配シプラグが確認された当日の午後4~6時)の受精卵に対してGONAD法を試すこととした。その結果、31%(11/36)の個体に変異が導入されていることを確認した。これは、KOマウスを作製する上では実用的な効率である。さらに0.7日胚で処理することは(i)卵管内の受精卵の存在位置が限局されている(核酸溶液の注入が容易になる)、(ii)0.7日胚はまだ1細胞期胚であると考えられ、2細胞期胚である1.5日胚にGONAD処理を施す場合と比較してゲノム編集のモザイク率が低いことが期待される、といった利点を有すると考えられた。

また、これらの変異は次世代に伝搬することを確認しており、その子孫から期待される白内障の症状を呈する個体(白内障モデルマウス)を得ることに成功した。

・Cas9タンパク質と crRNA/tracrRNA (リボヌクレオチドプロテイン: RNP) を用いることによる効率改善

研究を進めている中で、mRNAではなくタンパク質の Cas9 を用いて、より効率よくゲノ

ム編集を行える報告が出てきたため、Cas9 タンパク質と crRNA/tracrRNA を用いて GONAD 法によるゲノム編集が可能か否か、また、その効率を調べた。*Foxe3* 遺伝子に対する crRNA を準備し、crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質と混合して GONAD を行った。妊娠中期胚で解析を行った結果、驚くことにそのほぼ全て (97%, 35/36) が *Foxe3* 遺伝子の標的領域近傍に *indel* 変異を有していることが分かった。Cas9 mRNA/sgRNA を用いた時は 31% (11/36) の変異導入効率だったことから、リボ核タンパク質を用いることが GONAD 効率の大幅な効率改善に繋がるということが示唆された ($p < 0.001$)。Cas9 タンパク質や crRNA、tracrRNA については全て購入可能であり、実験者が自前で調製する必要もないため、実験に要する時間の節約にも繋がるという利点もある。RNP による GONAD を improved GONAD (*i*-GONAD) と命名した。

・ssODN による *Tyr* 遺伝子レスキュー

上記 *Foxe3* の結果から RNP で高効率な GONAD が可能であることが示唆されたことから、RNP を用いればノックインも可能であるのではないかと考え、それを検証するために、次に RNP を用いてのチロシナーゼ遺伝子レスキュー実験を行った。MCH(ICR)マウスのチロシナーゼ (*Tyr*) 遺伝子はコード領域の 308 番目の塩基が G から C に変異しており、その結果アミノ酸がシステインからセリンに変異してしまうことから、MCH(ICR)マウスは正常な活性を持つチロシナーゼ酵素を発現しない。今回、その変異領域に gRNA 標的配列を設計し、野生型配列を有する ssODN を導入することによるレスキュー実験をデザインした (図 2)。

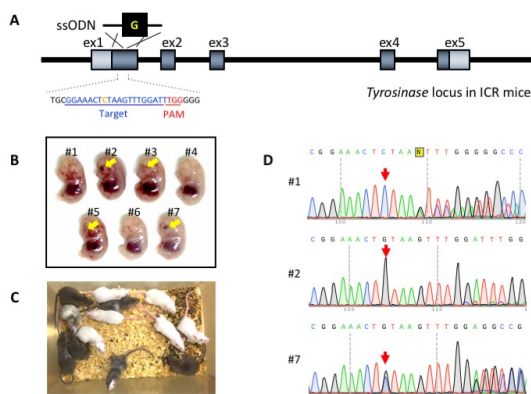


図2: GONAD法による *Tyr* 遺伝子の修復

13 個体の妊娠 MCH(ICR)マウスを GONAD 処理し、妊娠中期胚で解析、あるいは出産させた仔マウスでの解析を行った。その結果、計 74 個体の embryos または pups を回収することができ、そのうちの 36 個体 (49%) が色素 (胚での解析では目の色、出産させたものでは毛色) を有していた (図 2)。塩基配列を確認した結果、色素を有する全ての個体で、変異が野生型に修復されているアレルを有していることがわかった。これは、ssODN が

挿入されたことを示唆しており、*i*-GONAD 法で ssODN の高効率ノックインが可能であることがわかった。

上述した *Tyr* 遺伝子レスキュー実験で得られた個体の多くは、他のアレルとして新たな *indel* が入っている場合もあることがわかった。それらを考慮すると、最終的にゲノム編集された個体 (KI and/or *indel*) は 89% (66/74) であった。

なお、GONAD 法は BTX 社のエレクトロポレーター (BTX T820) 機器のみでなく、BEX 社の CUY21EditII、および NEPAGENE 社の NEPA21 と言った最新型のエレクトロポレーターでも同様の効率で動くことを確認できた。

・GONAD 法による large deletion 個体の作製

CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いると、*indel* 作製や SNP の挿入だけでなく、大きな DNA 領域の欠損作製を受精卵で行うことが可能である。そこで、本研究では、GONAD 法でも欠失を作製できるか否かを検討した。今回、B6 マウスのアグーチ遺伝子のイントロン 1 に存在する retrotransposon 配列を欠損の標的として選択した。その外側に設計した 2 箇所の標的配列に DNA 2 本鎖切断を入れることで、retrotransposon 配列を含んだ 16.2kb の領域が欠失することが期待される。それにより、B6 の黒の毛色がアグーチ色にレスキューされることが期待される (図 3)。さらに、

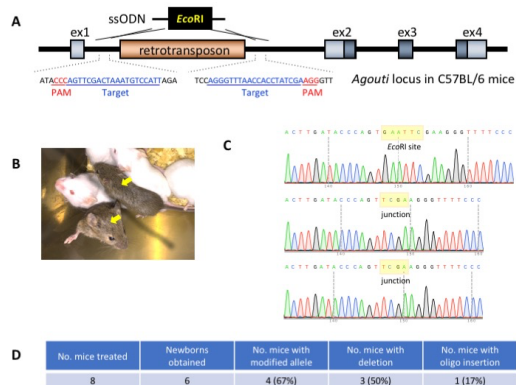


図3: GONAD法によるアグーチ遺伝子の修復 (large deletionを介して)

欠損させた際の両末端の結合を正確に行うことを目的とし、repair 部位に挿入可能な配列を有する ssODN も同時に用いた。8 匹の妊娠 B6 マウス (0.7 日胚を有する) の卵管に Cas9 タンパク質、2 種類の crRNA/tracrRNA、ssODN を同時に注入して GONAD 処理を行った結果、6 匹の仔マウスを帝王切開にて回収することができた。これらの仔マウスの中にはアグーチの毛色を示すものもあり、genotyping を行ったところ、欠失を有する個体が最終的に 3 個体 (50%) いることがわかった。そのうちの 1 個体 (回収したマウスの 1/6, 17%) は、正確に ssODN が挿入されていた。アグーチの毛色を示した他の 2 個体では ssODN の挿入は認められなかったものの、おそらく短い相同領域を介した修復により、同じ欠失アレルを有していた。また、欠失を生じなかった個体の中にも、1 個体において

5'側の標的領域と3'側の標的領域にそれぞれ *indel* が認められたことから、最終的にゲノム編集された個体 (large deletion and/or *indel*) は67% (4/6)であった (図3)。これにより、GONAD法を用いて large deletion 個体を作製できることが示された。

・ *i*-GONAD法と顕微注入法の効率の比較

i-GONAD法と従来の顕微注入法のマウス作製効率の比較・解析を行った。この際に標的とした遺伝子はMCH(ICR)アルビノマウスの変異型 *Tyr* 遺伝子であり、ssODNを用いた遺伝子レスキュー実験を進めた。最終的に339個の受精卵に顕微注入し、242個の胚を移植し、62個の胎児を得た。そのうちの32個体 (52%) が色素が回復した個体であり、新たに生じた *indel* 変異を含めると、79% (49/62) がゲノム編集された個体であった。これは *i*-GONAD法の効率89% (66/74)と比較して有意な差は見出されなかった。従って、*i*-GONAD法は従来の顕微注入法と同様のゲノム編集効率であると結論付けた。しかしながら、*i*-GONAD法では顕微注入法と異なり偽妊娠マウスやそれを準備するための精管結紮マウスを必要としないため、結果として使用するマウス数の節約に繋がる。具体的には、顕微注入法で得たゲノム編集個体と同数のゲノム編集個体を *i*-GONAD法で得るためには、顕微注入法で要する個体数の2/3の個体数を使用すれば十分であり、動物愛護の点からも望ましい技術であると考えられる。

・ モザイク率の解析

GONAD法を妊娠0.7日 (後期1細胞期)に行うことにより、妊娠1.5日 (2細胞期)に行うGONAD法よりもモザイク率が減少することを期待していた。しかしながら、妊娠0.7日で行うGONAD法においてもCas9 mRNA/sgRNAを使用する限りでは得られた仔や胎児の82%がモザイクであった。一方で、Cas9タンパク質/crRNA/tracrRNAの組み合わせを用いることでモザイク率が36~65%に減少した。これは、mRNAを用いた場合は受精卵に導入されてからゲノムが編集されるまでに翻訳と言うステップが必要であるが、タンパク質で供給することで受精卵への導入と同時にゲノム編集が行われるためであると言える。よりモザイク率を下げるためにはより早い時期 (妊娠0.2日など) にゲノム編集を行うことが望ましいが、その時期にGONAD法を行うことは、早朝に処置を行わなければならないこと、その時期は受精卵が卵丘細胞に強固に囲まれているため溶液を受精卵まで到達させることが難しいこと、などから困難である。従って、モザイク率を減少させる目的にはGEEP法のように体外受精卵への早い時期でのエレクトロポレーションが望ましいと考えられる。しかしながら、たとえモザイク個体であったとしても、その殆どが次世代に編集された遺伝子を伝えることがで

きることから、F0個体での解析を必須としない多くの研究ではモザイク率は問題とならないはずである。

・ AsCpf1での *i*-GONAD実験

i-GONAD法がCas9以外の他のゲノム編集酵素に応用可能かを追求する上で、AsCpf1酵素を用いた実験を行った。標的遺伝子座位は *Hprt* 座位と *Tyr* 座位とした。 *Hprt* 座位の実験では、計5個体の妊娠マウスに *i*-GONAD処置を施し、40個体の胎児を回収した。遺伝子解析の結果、そのうち65% (26/40) が *indel* 変異を生じていることが分かり、AsCpf1が *i*-GONAD法に応用可能であることが示された。 *Tyr* 座位の実験では、Cas9を用いた時と同様にアルビノMCH(ICR)系統の変異 *Tyr* 遺伝子の修復を目指した (図4)。計4個体の妊娠マウスに *i*-GONAD処置を施し19個体の胎児を回収した。表現型解析および遺伝子解析の結果、そのうち58% (11/19) において変異アリルが修復され色素を有していた。新たに生じた *indel* 変異も含めると、74% (14/19) が何らかのゲノム編集が行われていた (図4)。以上の結果から、*i*-GONAD法はAsCpf1酵素にも応用可能であり、高効率でゲノム編集を施せることを示せた。

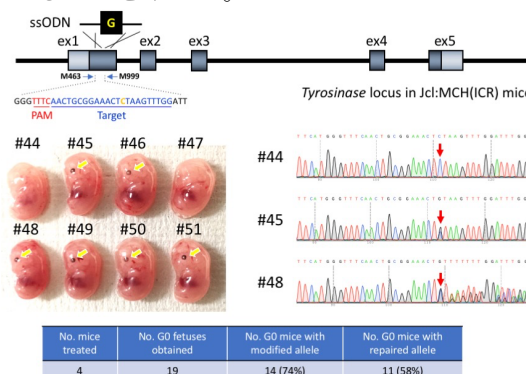


図4: AsCpf1を用いた *i*-GONAD法による *Tyr* 変異の修復

・ MCH(ICR)以外の複数の系統での *i*-GONAD法の応用の可能性について

上述した多くの実験ではMCH(ICR)系統を用いていたため、C57BL/6純系系統を含めた他の系統での *i*-GONAD法の可能性を調べた。重井医学研究所の松山先生や浜松医科大学の高林先生らとの共同研究で、複数系統での *i*-GONAD実験を行った。新たに使用した系統は、C3H/HeSlc、C57BL/6NcrSlc、DBA/2CrSlc、B6D2F1/Slc、C57BL/6Ncr1、BALB/cAJclと、B6D2F1/SlcとC57BL/6NcrSlcのハイブリッド系統である。標的とした遺伝子座位は *Tyr*、*Kit*、*Cdkn1a*、*Cdkn2a*である。最終的な結果として、C57BL/6NcrSlcを除いた全ての系統でのゲノム編集に成功した。仔や胎児が得られたものについては、そのゲノム編集効率は高かったが、特に純系の系統において着床・妊娠を継続させたマウスを得ることが難しい場合があった。C57BL/6NcrSlcにおいてゲノム編集に成功しなかったのは、そもそも仔

が得られなかったためである。これは、*i*-GONAD 処置を施さなかった個体でも同様であったことから、エレクトロポレーション等の影響ではないと考えている。以上の結果から、*i*-GONAD 法は多くのマウス系統で高効率で動くものの、純系系統のマウスについては、確実に妊娠マウスが得られる条件を見出す必要性がある、と結論付けた。

<得られた成果の国内外における位置づけとインパクト>

GONAD 法は体外に胚を取り出すことなくゲノム編集動物作製が行える唯一の技術であり、その発表直後から多くの問い合わせを受けるなどその注目度の高さが目立つものとなった。また、共同研究ベースでモデルマウス作製を行うこと、各種法の論文発表、技術の普及を目指した講習会やワークショップの開催、などを精力的に且つ国際的に進めることができた(図5)。国内外の学会、研究機関から複数の講演にも招待され、国際的にインパクトのある研究成果を上げることができたと言える。

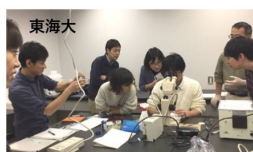
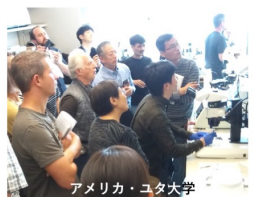
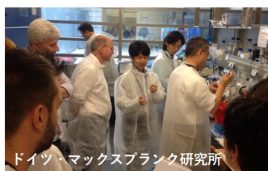


図5: *i*-GONAD法のワークショップ、研修会(2017年)

<今後の展望>

SNS 等で外部研究機関から *i*-GONAD 実験の再現成功についての報告もなされ、今後も国内外の様々な研究者が本手法に挑戦するものと期待される。既に共同研究者らによってラットでの GONAD 法の確立にも成功しているが、今後はそれ以外の他生物種での *i*-GONAD 法が注目されてくると予想される。また、マウスにおいても純系系統での安定した *i*-GONAD 法の確立、コンディショナルノックアウト用の flox アリルの作製のようなより高度な遺伝子改変マウス作製への応用、と言った課題も残されている。さらに、最適化された *i*-GONAD 法のプロトコル論文の執筆も進める予定である。

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] (計 5 件)

- ① Kobayashi T., Namba M., Koyano T., Fukushima M., Sato M., Ohtsuka M. and

Matsuyama M. Successful production of genome-edited rats by the rGONAD method. BMC Biotechnol.18:19 (2018) 査読有 DOI:10.1186/s12896-018-0430-5

- ② Ohtsuka M., Sato M., Miura H., Takabayashi S., Matsuyama M., Koyano T., Arifin N., Nakamura S., Wada K. and Gurumurthy CB. *i*-GONAD: a robust method for *in situ* germline genome engineering using CRISPR nucleases. Genome Biol. 19: 25 (2018) 査読有 DOI:10.1186/s13059-018-1400-x
- ③ Gurumurthy C. B., Takahashi G., Wada K., Miura H., Sato M. and Ohtsuka M. GONAD: a novel CRISPR/Cas9 genome editing method that does not require ex vivo handling of embryos. Curr. Protoc. Hum. Genet. 88:15.8.1-15.8.12. (2016) 査読有 DOI:10.1186/s13059-018-1400-x
- ④ Takahashi G., Gurumurthy C. B., Wada K., Miura H., Sato M. and Ohtsuka M. GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. Sci Rep. 5: 11406 (2015) 査読有 DOI:10.1186/s13059-018-1400-x

[学会発表] (計 22 件)

- ① Ohtsuka M. *i*-GONAD: A Method for Genome Editing Rodents without ex vivo Handling of Embryos. New Frontiers in CRISPR-based Gene Editing (Part of the 25th International Molecular Medicine Tri-Conference), February, 2018
- ② 大塚正人 GONAD: *ex vivo* 胚操作を要しないゲノム編集マウス作製手法. 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月
- ③ M Sato, S Nakamura, CB Gurumurthy, S Watanabe, M Ohtsuka Improved GONAD (*i*-GONAD) (II): usefulness of rhodamine-dextran for monitoring the success of the GONAD and of gonadotrophin-based regulation of the timing for the GONAD 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017) October 2017
- ④ M Ohtsuka, H Miura, CB Gurumurthy, M Sato Improved GONAD (*i*-GONAD) (I) as ex vivo manipulation-free genome-editing system allowing efficient knock-out, large deletion, and knock-in 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017) October 2017
- ⑤ H Miura, N Arifin, M Sato, M Ohtsuka Rescue of the albino phenotype in mice using GONAD method. International Pigment Cell Conference 2017(IPCC2017)

2017. 8

- ⑥ 大塚 正人, 三浦 浩美, 佐藤 正宏 採卵、顕微注入、胚移植のステップが不要なゲノム編集マウス作製法 GONAD によるノックインマウス作製 日本ゲノム編集学会第 2 回大会、2017 年 6 月
- ⑦ 大塚 正人、高橋 剛、三浦 浩美、和田 健太、佐藤 正宏 GONAD 法：採卵、顕微注入、胚移植のステップが不要なゲノム編集マウス作製法 第 39 回日本分子生物学会年会 (BMB2016)、2016 年 11 月
- ⑧ 大塚 正人, 高橋 剛, 和田 健太, 三浦 浩美, Channabasavaiah B Gurumurthy, 佐藤 正宏 採卵、顕微注入、胚移植を要しないゲノム編集マウス作製法 GONAD によるノックアウトマウス作製 第 63 回日本実験動物学会総会、平成 28 年 5 月
- ⑨ M Sato, CB Gurumurthy, S Watanabe, M Ohtsuka Improvement of GONAD (genome-editing via oviductal nucleic acids delivery), one of the zygote injection-free genome editing systems targeted to preimplantation embryos 13th Transgenic Technology Meeting (TT2016) March 2016
- ⑩ M Ohtsuka GONAD and Easy (*Isi*)-CRISPR: novel mouse genome engineering tools 13th Transgenic Technology Meeting, Prague, Czech Republic, 2016 年 3 月
- ⑪ 佐藤正宏、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、稲田絵美、齋藤一誠、渡部聡 zygote injection に依らない生殖細胞、胚を標的とした遺伝子導入による CRISPR/Cas9 genome editing の可能性 第 38 回日本分子生物学会年会 (BMB2015)、2015 年 12 月
- ⑫ M Ohtsuka, G Takahashi, K Wada, H Miura, CB Gurumurthy, M Sato GONAD: a novel CRISPR/Cas9 genome editing method that does not require *ex vivo* handling of fertilized eggs 29th International Mammalian Genome Conference (IMGC) 2015 年 11 月
- ⑬ 大塚 正人 Channabasavaiah B Gurumurthy 三浦浩美 佐藤正宏 和田健太 高橋剛 GONAD：採卵、顕微注入、移植を要しない新規ゲノム編集マウス作製法 第 108 回日本繁殖生物学会大会；2015 年 9 月
- ⑭ 高橋 剛、Channabasavaiah B Gurumurthy、和田 健太、三浦 浩美、佐藤 正宏、大塚 正人 *ex vivo* 処置を介さない CRISPR/Cas9 系による遺伝子改変マウス作製法「GONAD」の開発 第 12 回北海道実験動物研究会総会・学術集会 2015 年 7 月
- ⑮ 高橋剛、和田健太、三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人 採卵、顕微注入、胚移植を要

しない新規ゲノム編集マウス作製法
第 29 回モロシヌス研究会 2015 年
7 月

- ⑯ 高橋剛、和田健太、三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人 卵管を介したマウス 2 細胞期胚への RNA 導入法の開発とゲノム編集技術への応用 第 62 回日本実験動物学会総会 (大会) 平成 27 年 5 月

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：「哺乳動物の受精卵に物質を導入する方法」
発明者：大塚正人、森泉俊幸、森泉康裕
権利者：株式会社ベックス、学校法人東海大学
種類：特許
番号：特願 2017-233100 号
出願年月日：2017 年 12 月 5 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等
<http://masato2.wix.com/ohtsuka-lab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 正人 (OHTSUKA, Masato)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：90372945

(2) 研究分担者

和田 健太 (WADA, Kenta)
東京農業大学・生物産業学部・准教授
研究者番号：20508113

(3) 連携研究者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・教授
研究者番号：30287099

(4) 研究協力者

三浦 浩美 (MIURA, Hiromi)
東海大学・医学部・特定研究員
研究者番号：90599523