

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05456

研究課題名(和文) iPS技術とIn Silico創薬による髄核前駆細胞の分化制御と椎間板修復

研究課題名(英文) Intervertebral disc regeneration and transcriptional control of nucleus pulposus progenitor cells by in silico pharmacogenesis and iPS technology

研究代表者

酒井 大輔 (SAKAI, Daisuke)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10408007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：腰痛は障害の主原因とされ、社会経済的負担である。椎間板障害は腰痛の主因であり、椎間板細胞を人為的に導出する手法は未だ確率されないため、椎間板の髄核細胞へ直接リプログラミングするため、転写因子のスクリーニングを試みた。我々はマイクロアレイやiPSC干渉アッセイ、siRNAアッセイ、遺伝子アップレギュレーションアッセイ、直接細胞リプログラミングを適用した。その結果、これまでの研究期間において、髄核細胞マーカー(免疫組織化学でのACANとCOL2A1とKRT18など)の顕著な発現を誘導する強力な3つの転写因子の組み合わせを軸としたリプログラミング方法を見だし、特許技術として出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、腰痛の新規治療法として、細胞移植を中心とした技術が検討されているが、本研究の結果は椎間板細胞製品のコストダウン、有効性の向上へ寄与できる技術となったほか、未だ発見されていない技術であるため科学的にも意味が大きい研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Low back pain is considered the major cause of disability worldwide and is linked to a significant socio-economic burden on health care and social security systems.

Intervertebral disc disorder is a major cause of low back pain, and a method for artificially deriving intervertebral disc cells has not yet been established. A method for artificially deriving intervertebral disc cells has not been established yet. We set out to search for a method to directly reprogram the intervertebral disc into nucleus pulposus cells. Therefore, we first attempted a comprehensive screening approach to identify transcription factors essential and highly related to the nucleus pulposus cell phenotype. We applied microarray, iPSC interference assay, siRNA assay, gene upregulation assay, and direct cell reprogramming. Combination of 3 strong transcription factors that induces prominent expression of nucleus pulposus cell markers were identified and patented.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：椎間板変性 再生医療 髄核細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰痛と頸部痛は一般的な健康問題であり、全世界の6億3,200万人の人々に影響を与え、世界中の障害の主要な原因となっている。両障害は、仕事への障害と医療費によって大きな社会的および経済的負担をかける。すべての腰痛症例の20%を発症すると推定される椎間板変性疾患は脊柱に沿った生体力学を破壊し、椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症、脊椎すべり症およびその他の脊椎関連障害につながる。椎間板変性疾患は、特に椎間板(IVD)のコア内で、細胞外マトリックス組成の不可逆的な変性によって特徴づけられる椎間板障害である。

現時点では、これらの退行性変化の回復または根底にある病状を止めることができる臨床的に有効な治療法は存在しない。したがって、新たな治療の開発が強く求められている。それにもかかわらず、特に骨および関節軟骨の分野における知識の洞察と比較して椎間板の恒常性、細胞表現型、および病状の発症および進行の一般的な理解は乏しい。

椎間板は、脊柱に沿った各2つの椎骨間の線維軟骨構造物である。椎間板は、柔軟性を与えながら、脊柱に沿って機械的な力を分散することに関与している。この特徴は、密閉された髄核内に確立された静水圧から生じる。髄核は、プロテオグリカンおよび緩やかに配置されたII型コラーゲン繊維を主成分とし、比較的多量の水分を吸収する。髄核は、線維輪と呼ばれる線維性軟骨層によって水平に囲まれている。最後に、椎間板は、椎骨との境界上の硝子軟骨の薄い層、すなわち終板によって覆われる。老化および摩耗により、髄核はTie2 / GD2陽性前駆細胞の漸減を示し、細胞は老化し線維性の細胞に切り替わる。これらの変化は、結果としてプロテオグリカンに富む髄核細胞外マトリックスを線維性の構造に変化させ、椎間板の静水圧および他の生体力学的特徴を悪化させる。これらの事象のカスケードは、潜在的に腰痛および他の脊椎変性疾患をもたらす。逆に、椎間板変性疾患および関連障害は、他の動物モデル(例えばブタ、マウス、ラットなど)ではめったに見られない。特に、これらの動物は元々のNP様表現型を維持し、NP細胞の活性および表現型が健康な椎間板を維持し、椎間板障害を予防する上で決定的な役割を果たすことを示唆している。したがって、椎間板細胞集団を増強する方法または能動的にマトリックス産生細胞を有する椎間板を再増殖するための戦略の確立に強研究重点が置かれている。

生まれてから、髄核に位置する細胞は、空胞化した脊索細胞から軟骨細胞様のNP細胞に変化する。老化および生物学的および機械的ストレスにより、軟骨細胞様NP細胞は老化および線維症の表現型に徐々に変化し、全体の前駆細胞数が低下し、IVDの細胞外基質組成が変化する。この減少は、脊柱に沿った圧力を分散させる椎間板の生体力学的特性に影響を及ぼし、更なる変性及び更なる脊柱関連障害の誘発のリスクをもたらす。最近の10年間で、激しい研究は、椎体間椎間板細胞集団の再増殖または再活性化を目的とした治療的アプローチを必要としていた。髄核の組織再生の源として、様々な細胞が探索されており、動物モデルや初期の臨床試験で有望な結果が得られている。細胞移植の成功は、最適な細胞型と供給源の選択に大きく依存する。移植された細胞は、厳しい椎間板微小環境内で生き残る必要がある。髄核の無血管性および進行性の変性のために、髄核微小環境は比較的酸性、低血糖、低酸素および高浸透圧である。生存することに加えて、移植された細胞は増殖し、周囲の細胞を再活性化するためにマトリックスタンパク質またはサイトカインを能動的に産生および分泌する必要がある。最初のヒトの研究では、間葉系幹細胞(MSC)、若年性軟骨細胞、椎間板細胞、さらには造血幹細胞の移植が検討されている。全体的な結果は有望だが、すべての細胞型は制限がある。MSCは厳しい椎間板環境には馴染まず、機械的な力を受ける。MSCは分化能力を示すが、これらの細胞が椎間板の長期における再生に寄与できるかどうかは明らかにされていない。一方、椎間板由来細胞および軟骨細胞は、これらの過酷な条件下で生存および増殖するためにはより良好に機能するはずであるが、これらの細胞は容易に接近できない。さらに、これらの細胞は、一般に、疾患、年齢、または外傷によって

損なわれた組織源から収穫される。要するに、最適な細胞型および供給源は決められたままである。

2. 研究の目的

そこで椎間板変性疾患の治療のための細胞移植等に用いることができるよう、所望の体細胞から、活性化髄核細胞表現型へ分化転換することができる、つまり誘導髄核細胞を作製することができる、再現可能な方法を開発することを一つの目的とした。そして後述する実施例の記載に示された実験結果に基づいて、分化を終えた体細胞(例えば線維芽細胞)から活性化髄核細胞表現型への分化転換を維持し、誘導することのできる特定の遺伝子(髄核マスターレギュレーター転写因子)を見つけ出し、前記課題を解決した本発明を完成させた。

本発明の髄核マスターレギュレーター転写因子を、適切な細胞培養条件下で体細胞に導入し過剰発現させることにより、その細胞を確実に活性型髄核細胞表現型に直接的に分化させることができる。このようにして得られる誘導髄核細胞は、髄核の過酷な微小環境下で生存することができ、プロテオグリカン、コラーゲンおよび他の髄核関連ECMタンパク質を能動的に産生する。誘導髄核細胞は、脊髄疾患または老化によって損傷していない健全な髄核細胞の、信頼できる豊富な供給源となり、また潜在的に自己由来とすることができるため、非自己(ドナー)由来の有害物質を含まない無害な細胞製剤を製造できるようになる。本発明によれば、誘導髄核細胞を実質的に無限に供給することが可能となり、豊富な誘導髄核細胞を椎間板変性疾患の治療、診断、および予防のために積極的に利用することが可能となる。また、本発明の髄核マスターレギュレーター転写因子は、分化後の体細胞から髄核細胞を作製するために利用できるだけでなく、万能性または多分化能を有する幹細胞から髄核細胞を作製するために利用することもできる。

3. 研究の方法

本研究の実施に際しては、東海大学病院の機関倫理審査委員会からヒト組織サンプルの採取と使用に関する承認が与えられた。さらに、十分な説明に同意した患者からのみ、外科的切除した組織材料を得た。組織分離、播種した細胞を、さらに使用するまで 37 °C、5%CO₂、および 5%O₂ で培養した。

(1) マイクロアレイアッセイ

髄核細胞を 3,000 ~ 5,000 細胞/cm² の密度で播種し、37 °C、25%O₂ 湿潤チャンバー内で 10% (vol / vol) FBS、MEM (Gibco) で増殖させた。SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 Microarray (Agilent Technology) と Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technology) を用いて分析し、ソフトウェア、Feature Extraction 7 (Agilent Technology) を用いて Agilent DNA Microarray Scanner (G2565CA) により分析した。得られた発現値を、差し引きにより神経前駆細胞 (ID GSM1608144, GSM1608145)、線維芽細胞 (ID GSM1191059, GSM1191060, GSM1191061)、iPSC 細胞 (ID GSM1598135, GSM1598136, GSM1598137) および肺細胞 (ID GSM1700910, GSM1700913) からの発現レベルと比較した (平均値での比較)。

(2) iPSC 細胞干渉アッセイ

iPSC 細胞培養用のマウス SNL フィーダー細胞を、0.1%ゼラチン被覆ウェル上に播種し、70 ~ 80%培養密度まで増殖させた。OCT3 / 4, SOX2, KLF4, CMYC および追加のマスターレギュレーター転写因子候補のウィルスベクター (pMXs) を遺伝子導入した。髄核細胞をマイトマイシン C 処理した SNL フィーダー細胞上に播種した。さらに、髄核培養物を 21%O₂ に切り替え、1 日おきに培地交換した。遺伝子導入の 6 日後に、培地を、10ng / mL の線維芽細胞増殖因子 (FGF)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン添加 ReproCELL primate ES 細胞培地 (ReproCell, Japan) に置き換えた。iPSC 細胞誘導を合計で 2 週間続けた後、培養物を固定し、アルカリホスファターゼ染色キット (MUTO pure chemicals, 日本) により製造

説明書に従って染色した。

(3) siRNA アッセイ

髄核細胞培養物に、製造説明書に従って DharmaFECT siRNA 分子 (GE Healthcare, USA) を供した。細胞への siRNA の形質導入後、24 時間または 48 時間のいずれかで 37 °C、2%O₂ 下で 10%FBS 添加 Mem で培養した。続いて、細胞を後述の PCR 分析のために回収した。

(4) 髄核細胞誘導培地の最適な増殖因子の組み合わせの評価

ヒト骨髄由来 MSC (Lonza, Switzerland) を、50nM L-アスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 n-水和物 (WAKE, Japan)、6,25 μg/mL のインスリン - トランスフェリン - セレン-x (ThermoFisher, USA)、および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した DMEM 高グルコース (Dulbecco, USA) で構成される髄核細胞誘導培地 (NPIM) で 2 週間培養した。さらに、10nM デキサメタゾン を添加した。並行して、MSC を 5mL の NPIM 中に別々に懸濁させ、15mL のプロピレン遠心管に 250g で 5 分間遠心分離した。細胞培養物を 37 °C、21%O₂ 湿潤チャンバーでインキュベートした。2 日後、TGF-β1、TGF-β2 または TGF-β3 (10ng / mL) を含む単層および細胞ペレット培養培地に GDF5 または GDF6 (100ng / mL) を追加補充し、培養物を 5%O₂ 湿潤チャンバーに移した。培地は 2 日ごとにリフレッシュした。単層培養物を、0.25%EDTA /トリプシンでトリプシン処理することにより 2 週間後に収穫し、リアルタイム PCR 分析のために溶解溶液 (Ambion, USA) によって溶解させた。ペレット培養物を第 3 週に収穫し、Tissue-TEK O.C.T. 化合物 (Sakura Finetek USA, USA) を添加し、液体窒素で急速凍結した。続いて、固定されたペレットをクライオスタットにより 8 μm の切片にスライスした。各ペレットを、1g/L のサフランin-O、800mg / L ファストグリーン FCF 染色溶液で染色した。

(5) マスターレギュレーター転写因子を利用したダイレクトプログラミング

上記のように、種々の髄核マスターレギュレーター転写因子候補の遺伝子の組み合わせを、ヒト皮膚真皮線維芽細胞に形質導入した。空の VSVG ウイルス粒子を用いた遺伝子導入を擬似対照として行った。リアルタイム PCR 分析のために Ambion 溶解溶液を用いた溶解によって遺伝子導入の 3 週間後に線維芽細胞を採取した。

4. 研究成果

(1) 髄核細胞における特異的転写因子発現

マイクロアレイデータは、ヒト神経前駆細胞、ヒト肺細胞、ヒト誘導性多能性幹細胞、およびヒト真皮線維芽細胞と比較して、髄核細胞において比較的高い発現を示す 131 個の別個の転写因子のアレイを明らかにした。特に、PAX1、PITX1、および Brachyury (T) は、ヒト神経前駆細胞、ヒト肺細胞、ヒト iPSC、またはヒト真皮線維芽細胞の発現レベルと比較して、平均でそれぞれ 52 倍、36 倍および 31 倍の発現量の増加を示した。

(2) iPSC 細胞干渉アッセイ

以前高橋らによって述べられたように (Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).)、OCT3 / 4、c-MYC、SOX2、および KLF4 のヒト髄核への導入は、iPSC コロニーの形成を成功させたが、これら 4 つの山中因子の組み合わせに、前記マイクロアレイデータで対象とした各転写因子を添加すると、そのうちの 86 個の転写因子について、iPS 細胞への誘導が妨げられた。特に、転写因子 PITX1、T、HOXC9、EBF1、NFIX、NFIA、KLF6 および KLF9 の添加により、iPS 細胞のコロニー形成に対する完全な干渉 (コロニー形成のスコア = 0.000) が観察された

(3) siRNA アッセイ

T、HIF1、PITX1、および EPAS1 の siRNA による干渉 (siRNA 媒介干渉) は、それぞれに対応する遺

伝子(mRNA)の発現レベルの10倍の減少をもたらした。PAX1のsiRNA媒介干渉は、より限定されたPAX1の発現レベルの低下をもたらした。HOXC9を除いて、各siRNA媒介干渉はACAN発現レベルにおいて減少が観察される。特に、HIF3のsiRNA媒介干渉は、ACAN発現を減少させる強い傾向を示す。注目すべきことに、PAX1の干渉は、T、EPAS1、およびSOX9の発現を増加させ、COL2A1、HIF1OおよびCA12を有意に増加させるようであるが、それにもかかわらず全体としてはACAN遺伝子発現に悪影響を及ぼす。全体的に、HIF3a、EPAS1、HOX6、SIX1、FOXQ1、HOXd10、NFIA、SOX9、SOX6、RUNX1、HIF1AおよびTのsiRNAによる干渉は、髄核マーカー発現レベルの一貫した減少を示した。

(4) アップレギュレーションアッセイ

髄核細胞またはMSC細胞における単一のマスターレギュレーター転写因子候補は、特にTおよびSOX6を過剰発現させた場合に、髄核細胞マーカーの発現のアップレギュレーションをもたらした。PITX1の過剰発現は、MSC内の髄核細胞マーカーの発現を増強したが、髄核細胞では発現しなかった。特に、髄核細胞培養ではPAX1の過剰発現は検出されなかった。さらに特記すべきことに、髄核細胞におけるTの過剰発現は、SOX9、COL2A1、ACAN、CD24およびOVOS2の増加をもたらした。同様に、SOX6の過剰発現は、PITX1、SOX9、COL2A1、HIF1、CD24およびOVOS2の発現の増加をもたらした。Tの過剰発現は、すべての過剰発現転写因子による強いアップレギュレーションを示した。

(5) 線維芽細胞のダイレクトリプログラミング

上記アップレギュレーションアッセイにおける最も有力な候補、すなわちT、SOX6、PITX1、RUNX1およびPAX1の遺伝子を、異なる組み合わせで導入された線維芽細胞は、ACAN、COL2A1、およびCD24の発現レベルを増加させることが明らかになった。SOX6/PITX1の組み合わせを除いて、すべての組み合わせは、上記候補の遺伝子を導入しなかった線維芽細胞と比較して、ACAN、COL2A1、およびCD24の3つのマーカーの発現を強く増加させた。

まとめ

髄核細胞の維持および分化に関するマスターレギュレーター転写因子の分析およびスクリーニングにより、我々は、髄核細胞表現型に向けて様々な細胞型を再現可能にリプログラムすることを可能にする誘導プロトコルを確立した。例えば、T、PITX1、およびSOX6の導入遺伝子の組み合わせの導入および過剰発現により、髄核細胞に向けて分化転換を誘導することができる。したがって、これらの細胞は、髄核細胞の形態をとり、2%O₂環境下でより高い生存率を示し、それらの細胞外マトリックスとして、アグリカンおよびII型コラーゲンを積極的に産生して沈着させる。さらに、mRNAおよびタンパク質レベルでの発現は、ACAN、CD24、およびHIF1Aにおける強いアップレギュレーションを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakai Daisuke, Schol Jordy, Foldager Casper B., Sato Masato, Watanabe Masahiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Regenerative technologies to bed side: Evolving the regulatory framework	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Translation	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jot.2017.02.001	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 該当する
1. 著者名 Mohd Isa Isma Liza, Abbah Sunny A., Kilcoyne Michelle, Sakai Daisuke, Dockery Peter, Finn David P., Pandit Abhay	4. 巻 4
2. 論文標題 Implantation of hyaluronic acid hydrogel prevents the pain phenotype in a rat model of intervertebral disc injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aaq0597	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 該当する
1. 著者名 Zhou Zhiyu, Zeiter Stephan, Schmid Tanja, Sakai Daisuke, Iatridis James C., Zhou Guangqian, Richards R. Geoff, Alini Mauro, Grad Sibylle, Li Zhen	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of the CCL5-Releasing Fibrin Gel for Intervertebral Disc Regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CARTILAGE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1947603518764263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shi Changgui, Qiu Sujun, Riester Scott M., Das Vaskar, Zhu Bingqian, Wallace Atiyayein A., van Wijnen Andre J., Mwale Fackson, Iatridis James C., Sakai Daisuke, Votta-Velis Gina, Yuan Wen, Im Hee-Jeong	4. 巻 -
2. 論文標題 Animal models for studying the etiology and treatment of low back pain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.23741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tam Vivian, Chan Wilson C.W., Leung Victor Y.L., Cheah Kathryn S.E., Cheung Kenneth M.C., Sakai Daisuke, McCann Matthew R., Bedore Jake, S?guin Cheryle A., Chan Danny	4. 巻 36
2. 論文標題 Histological and reference system for the analysis of mouse intervertebral disc	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 233-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.23637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tekari A, Chan SCW, Sakai D, Grad S, Gantenbein B	4. 巻 7
2. 論文標題 Angiopoietin-1 receptor Tie2 distinguishes multipotent differentiation capability in bovine coccygeal nucleus pulposus cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Stem Cell Research and therapy	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-016-0337-9	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 該当する

1. 著者名 Nakai T, Sakai D, Nakamura Y, Nukaga T, Grad S, Li Z, Alini M, Chan D, Mausda K, Ando K, Watanabe M	4. 巻 34
2. 論文標題 CD146 defines commitment of cultured annulus fibrosus cells to express a contractile phenotype	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 1361-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.23326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamichi R, Ito Y, Inui M, Onizuka N, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Mori M, Inagawa M, Ichinose S, Lotz MK, Sakai D, Masuda K, Ozaki T, Asahara H	4. 巻 7
2. 論文標題 Mohawk promotes the maintenance and regeneration of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 12503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms12503	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井大輔
2. 発表標題 表面マーカーを用いた細胞機能解析による椎間板再生の新知見
3. 学会等名 第45回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 酒井大輔
2. 発表標題 椎間板再生医療が開く脊椎変性疾患治療の未来
3. 学会等名 第89回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 髄核細胞マスターレギュレーター転写因子を含む分化誘導剤、誘導髄核細胞の製造方法、および誘導髄核細胞の用途	発明者 酒井大輔、ジョル ディショール、平石 駿介、升井伸治	権利者 学校法人 東海 大学、国立大学 法人 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-066535	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東海大の取り組む椎間板再生医療 http://sekitsui.med.u-tokai.ac.jp
--

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	檜山 明彦 (Hiyama Akihiko) (00514382)	東海大学・医学部・講師 (32644)	実験補助
研究分担者	平山 令明 (Hirayama Noriaki) (70238393)	東海大学・先進生命科学研究所・教授 (32644)	スクリーニング実験担当
研究分担者	升井 伸治 (Masui Shinji) (20342850)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授 (24303)	(35,700) 京都府立医科大学 (24,300) 山梨大学 変更: 2018年12月1日