

令和元年6月18日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09681

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症における蓄積タンパク質切断因子の解明と除去による治療戦略

研究課題名(英文) The therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis by elucidation and removal of accumulated protein-cleaving factors

研究代表者

詫間 浩 (TAKUMA, Hiroshi)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：00326258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)では多くの蓄積タンパク質、疾患原因遺伝子が見つかったが、運動ニューロン死を引き起こす作用機序は明らかになっておらず、治療への道筋は得られていない。本研究では、モデルマウスから得られたTDP-43関連microRNAはヒトALS大脳皮質運動野では特異的な変化はなかった。マイクロアレイによるヒト運動野の網羅的解析では、発現を変化させるmicroRNA、mRNA候補が数多く得られており、また簡便なスクリーニング法として酵母系も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初予定のin vivo電気穿孔法によるノックダウン・モデルマウスの開発には至らなかったが、ヒト脳におけるmicroRNAを含む遺伝子発現の網羅的データを得ることができた。これらの候補遺伝子の中には、ALSにおける神経変性の中核となる運動野において特異的に変化するものが多く含まれている。酵母による簡便なスクリーニング系も開発しており、今後の解析を通じて運動ニューロン死の実行役が同定されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), many accumulated proteins and disease causative genes have been found, however the precise mechanism causing motor neuronal cell death has not been clarified, and we don't get the path to ALS-treatment. In this study, TDP-43-related microRNAs obtained from model mice were not specifically altered in human ALS cerebral cortex motor cortex. In the comprehensive analysis of human motor area by microarray, we detected many microRNAs and mRNA candidates which expressions were changed, and a yeast system was also developed as a simple screening method for further study.

研究分野：神経内科学、分子細胞生物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 皮質運動野 TDP-43 microRNA

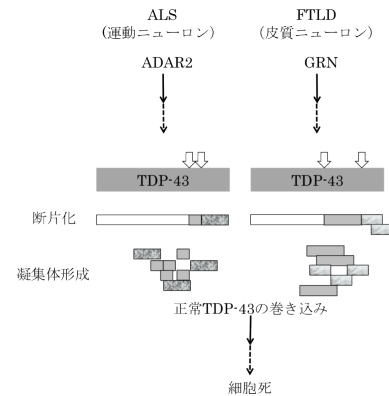
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、全身の運動ニューロンが徐々に死滅していく緩徐進行性の疾患である。現在のところまでいくつかの家族性の原因遺伝子が見つかってはいるが、神経細胞死を引き起こす明らかな機序は同定されておらず、有効な治療法は見つかっていない。研究代表者は、1999年にグルタミン酸受容体の RNA editing (編集) が ALS 患者組織において低下しており、ALS 発症に関与していることを初めて発見した (Takuma et al., *Ann Neurology* 1999)。その後、この機構は単一運動ニューロンや遺伝子改変動物においても確認されている (Kawahara et al. *Nature*、Hideyama et al. *J Neurosci*)。

2006年になり、前頭側頭型認知症 (FTLD) におけるユビキチン陽性封入体が TDP-43 というタンパク質から構成されていることが明らかになり、ALS 患者の運動ニューロンでも TDP-43 陽性封入体が認められた。この TDP-43 は DNA/RNA 結合タンパク質であり、スプライシング、発現調節や RNA の安定性に関与していると考えられている。TDP-43 は ALS 患者組織やマウス組織の ADAR2 欠失運動ニューロン内、リン酸化細胞質内封入体を形成していることが示されており (Aizawa et al., *Acta Neuropathol* 2010; Yamashita et al., *Nat Commun* 2012)、ADAR2 欠失と TDP-43 を介する細胞死や封入体形成には密接な関係があると考えられる。FTLD でも TDP-43 が蓄積するが、TDP-43 の分布と表現型 (高次機能障害の種類、運動ニューロン障害) により 4 種のサブタイプに分類され、プログラニューリン (GRN)、C9ORF72、VCP などの遺伝子変異がその発症に関与していることが明らかになっている。さらに ALS や FTLD のサブタイプにより、凝集体内の TDP-43 断片化部位が異なる事が示されている (Tsuji et al., 2012)。

TDP-43 による神経細胞死機構については未知の部分が多いが、ALS では ADAR2 欠失が関与し運動ニューロンが、FTLD (type A) では GRN 欠失が関与し皮質ニューロンが、TDP-43 の断片化を伴い細胞死を起こすと考えられる。



2. 研究の目的

TDP-43 の細胞選択的な毒性発現にはその断片化が重要と考えられるが、断片化の実行役は発見されていない。当初本研究では TDP-43 を疾患特異的切断に関係する因子を同定することを目標とし、まず ADAR2 欠失もしくは GRN 欠失で特徴的に発現が変化する遺伝子 (mRNA、microRNA) を抽出することを目的とした。mRNA と microRNA を組み合わせることで解析することにより、より精度が上がると考えられる。当初研究代表者らが開発した電気穿孔法による *in vivo* モデル系マウス (Akamatsu et al., 2013) を用い、モデルマウス組織から遺伝子欠失細胞を回収、RNA を採取し、マイクロアレイによる発現解析を行い候補遺伝子を抽出し、得られた候補遺伝子を TDP-43 発現培養細胞 (*in vitro*) に導入し、スクリーニングすることとしていた。

しかしながら *in vivo* におけるノックダウン系の構築が困難であり、時間的制約、研究組織上の制約を鑑み、ALS 患者脳組織での TDP-43 関連因子 (mRNA、microRNA) の抽出に絞り探索を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) GRN、ADAR2 ノックダウン

Neuro2a 細胞を 12 穴プレート上で 24 時間培養後、導入試薬 (Lipofectamine RNAiMAX) を用い常法に基づき GRN siRNA (Silencer Select, ambion; s201424, s67074, s67076) もしくは ADAR2 siRNA (MSS201350, MSS201352, MSS201356) を導入する。導入後 48 時間で一部回収し RNA 抽出を行い、 β アクチンをコントロールとし GRN もしくは ADAR2 について RT-PCR を行った ($\times 1$)。またさらにもう 1 回 siRNA を導入し同様に GRN 半定量を行った ($\times 2$)。

ADAR2 に関しては Alexa 標識した siRNA を電気穿孔法を用いてマウス胎仔脳に導入し、観察した。

(2) ALS、疾患対象各 5 例の凍結剖検脳を用い、運動野、小脳(対照)、後頭葉の各部位から 50-100mg の皮質組織を分離し、定法に則り miRNA を含む total RNA を精製し (miRNeasy Mini Kit, QIAGEN) 回収した。

microRNA を含む逆転写を行い (TaqMan MicroRNA kit)、前回課題で得られている TDP-43 発現に関連したヒト microRNA 候補 (miR34b, miR34c, miR204, miR449) について発現定量を行った。RNU24、RNU44、U6snRNA を内部標準とし、ALS と対照群において各部位での当該 microRNA の発現を比較した。

microRNA チップおよび messenger RNA チップ (3D-Gene、東レ) を用いて発現解析を行った。ALS 5 例、疾患対照 5 例の皮質運動野由来の total RNA を当量混合し、群として解析を行った。さらに統合解析を行い、ALS 運動野で特異的に変化する候補 microRNA を絞り込み検討した。

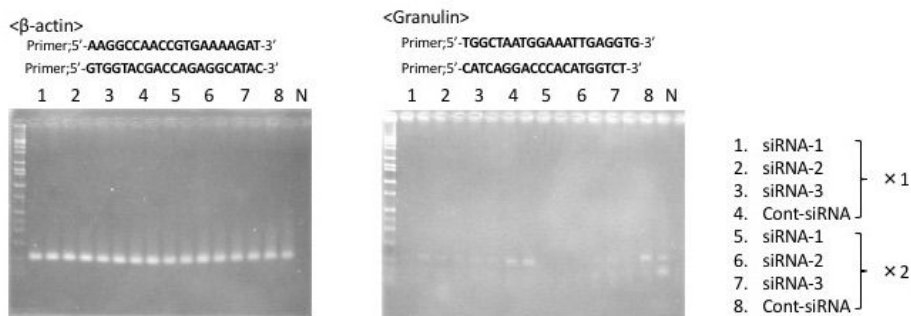
(3) 酵母における TDP-43 発現系の確立

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 発現プラスミドベクター-pREP1 上の nmt1 プロモーター下流の NdeI サイトに hTPD43、(hTPD43(A315T)、または(hTPD43(M337V)の ORF を挿入したプラスミド pTW1、pTW2、pTW3 を作製した。これらプラスミドを用いて *S. pombe* 野生型株 JY879 (h90 *ade6-M210 leu1-1 ura4-D18*) を酢酸リチウム法により形質転換し、チアミンを添加した合成培地 SD(+アデニン、ウラシル) 上で形質転換体を選択した。形質転換体を PBS に懸濁し、細胞密度 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 cells/ml となるように希釈したものを $10\mu\text{l}$ ずつチアミンを添加しない発現培地およびチアミンを添加した発現抑制培地にスポットし、30 度で 3 日間培養した。

4. 研究成果

(1) GRN、ADAR2 ノックダウン条件の決定

培養細胞系において、ADAR2、GRN に対する siRNA の配列選択と有効性確認を行った。GRN および ADAR2 が内因性に発現している培養細胞 (Neuro2a 細胞) に silencer Select siRNAs を導入し、ノックダウンを行なった。各 siRNA 導入後細胞から RNA を抽出し RT-PCR を行い発現量の低下を比較し、ノックダウンする最適な配列を決定した。GRN では siRNA-1 が最適であった (下図)。ADAR2 でも同様に行い、siRNA-1' が最適であった。



ADAR2-siRNA については Alexa555 標識を行い、*in vivo* マウス脳に導入したが、TDP-43 発現については大きな変化は認めなかった。

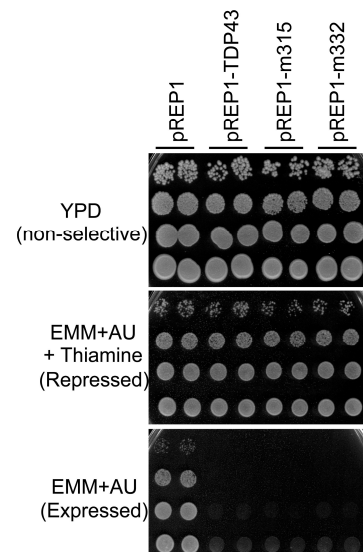
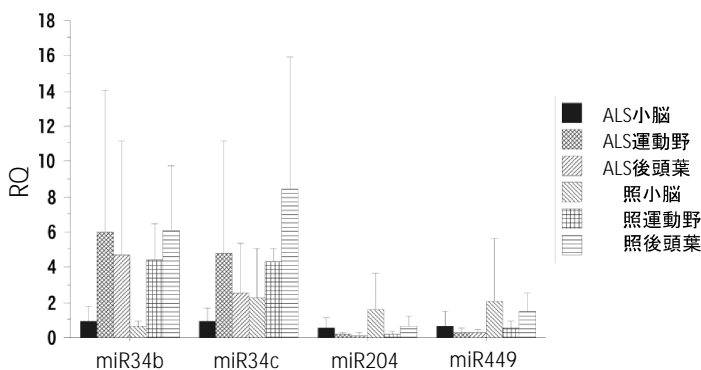
(2) DNA マイクロアレイ、microRNA チップによる解析のためのマウス大脳皮質からの神経細胞体分取、蛍光標識神経細胞の FACS セルソーターを用いての分離、total RNA の回収について試行し条件検討を行なった。

(3) ヒト組織での発現解析

マウスモデルより得られた TDP-43 関連 RNA 候補発現のヒトでの検討

前回課題において変異型 TDP-43 により特異的に変化すると考えられた microRNA についての知見を得ており、これらの一部について、ヒト組織における microRNA 発現を解析した。

後頭葉では miR204/449 において有意な発現差が認められたものの ($p=0.01, <0.001$)、ALS 運動野と対照群運動野で発現に差がある microRNA は認められなかった。(下図)



ALS患者と対照群ヒト脳でのmicroRNA、mRNAの発現変化を網羅的に解析するために上記凍結脳から採取したtotal RNAを用いてマイクロアレイ (microRNA、mRNA) により発現解析を行った。

発現量の違う多くの候補microRNA、messenger RNAが得られており、今後のさらなる研究の礎となるデータが得られた。

(4) TDP-43発現酵母系の確立 (右図)

これまでにヒト脳での網羅的解析からALS運動野で特異的に発現が変化するmicroRNA、mRNAの候補が数多く得られている。いくつかについては定量PCRによる発現解析での分別を試みたが、多くの候補を絞り込むには適当な方法とは言えない。このため候補を選別するために酵母を用いたスクリーニングを行なうこととし、酵母に野生型、変異型TDP-43を発現する系を確立した。野生型、変異型TDP-43を発現させると強い増殖阻害が観察された。今後プロモーターを最適化することにより発現量の調整を行うことを要するが、本系にmicroRNAを導入し、酵母増殖変化などを観察することにより、より簡便に候補microRNAなどの選別が行えると考えられる。

従前に *in vivo* 電気穿孔法による疾患モデル動物から得られていた TDP-43 関連 microRNA について、本課題においてヒト脳で検討し、また ALS 患者脳の RNA 解析により、TDP-43 関連のみならず ALS 運動野において特異的に発現を変化させる数多くの候補を得ることができた。今後は酵母系によるスクリーニングを通じ、これら多くの候補の中から TDP-43 に関連する microRNA などを探索することとなる。

ここから得られる結果は ALS などの神経変性疾患における神経細胞死メカニズムの疾患特異的な本質に迫るものであり、今後の治療戦略の進展に大きく貢献するものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Kameda H, Murabe N, Odagaki K, Mizukami H, Ozawa K, Sakurai M.: Differential innervation within a transverse plane of spinal gray matter by sensorimotor cortices, with special reference to the somatosensory cortices. *J Comp Neurol.* 2019;527(8):1401-1415. doi: 10.1002/cne.24626. 査読有
2. Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada N, Tamaoka A., Kametani F, Lakshmana MK, Araki W. TFEB-mediated enhancement of the autophagy-lysosomal pathway dually modulates the process of amyloid β -protein generation in neurons. *Neuroscience.* 2019. pii: S0306-4522(19)30030-2. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.010. 査読有
3. Odagaki K, Kameda H, Hayashi T, Sakurai M.: Mediolateral and dorsoventral projection patterns of cutaneous afferents within transverse planes of the mouse spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 2019;527(5):972-984. doi: 10.1002/cne.24593. 査読有
4. Hosaka T, Yamashita T, Teramoto S, Hirose N, Tamaoka A., Kwak S. DAR2-dependent A-to-I RNA editing in the extracellular linear and circular RNAs. *Neurosci Res.* 2018. pii: S0168-0102(18)30587-X. doi: 10.1016/j.neures.2018.11.005. 査読有
5. Nakamagoe K, Yamada S, Kawakami R, Miyake Z, Tozaka N, Okune S, Takeda H, Koganezawa T, Tamaoka A. Vestibular dysfunction as cortical damage with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2018;397:4-8. doi: 10.1016/j.jns.2018.12.006. 査読有
6. Hosaka T, Yamashita T, Teramoto S, Hirose N, Tamaoka A., Kwak S: DAR2-dependent A-to-I RNA editing in extracellular linear and circular RNAs. *Neurosci Res* in press. Doi: 10.1016/j.neures.2018.11.005 査読有
7. Murabe N, Mori T, Fukuda S, Isoo N, Ohno T, Mizukami H, Ozawa K, Yoshimura Y, Sakurai M.: Higher primate-like direct corticomotoneuronal connections are transiently formed in a juvenile subprimate mammal. *Sci Rep.* 2018;8(1):16536. doi: 10.1038/s41598-018-34961-z. 査読有
8. Terada M, Suzuki G, Nonaka T, Kametani F, Tamaoka A., Hasegawa M. The effect of truncation on prion-like properties of α -synuclein. *J Biol Chem.* 2018. pii: jbc.RA118.001862. doi: 10.1074/jbc.RA118.001862. 査読有
9. Yamashita T, Kwak S.: Cell death cascade and molecular therapy in ADAR2-deficient motor neurons of ALS. *Neurosci Res* in press. doi: https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.06.004 査読有
10. Ishiura H, Doi K, Mitsui J (他 56 名), Tamaoka A., Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2018. doi: 10.1038/s41588-018-0067-2. 査読有
11. Umeda T, Kimura T, Yoshida K, Takao K, Fujita Y, Matsuyama S, Sakai A, Yamashita M, Yamashita Y, Ohnishi K, Suzuki M, Takuma H., Miyakawa T, Takashima A, Morita T, Mori H, Tomiyama T. Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer's disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):59. doi: 10.1186/s40478-017-0461-5. 査読有
12. Hosaka T, Ishii K, Miura T, Mezaki N, Kasuga K, Ikeuchi T, Tamaoka A. A novel frameshift GRN mutation results in frontotemporal lobar degeneration with a distinct clinical phenotype in two siblings: case report and literature review. *BMC Neurol.* 2017;17(1):182. doi: 10.1186/s12883-017-0959-2. 査読有
13. Boonruamkaew P, Chonpathompikunlert P, Vong LB, Sakaue S, Tomidokoro Y, Ishii K, Tamaoka A., Nagasaki Y. Chronic treatment with a smart antioxidative nanoparticle for inhibition

- of amyloid plaque propagation in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):3785. doi: 10.1038/s41598-017-03411-7. 査読有
14. Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Makioka K, Okamoto K, Fujisawa T, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H, Julien JP, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Kaneko S, Ayaki T, Ito H, Kaji R, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 2017;9(391). pii: eaaf3962. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3962. 査読有
 15. Mamada N, Tanokashira D, Ishii K, Tamaoka A, Araki W. Mitochondria are devoid of amyloid β -protein ($A\beta$)-producing secretases: Evidence for unlikely occurrence within mitochondria of $A\beta$ generation from amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(2):321-328. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.035. 査読有
 16. Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, Tamaoka A, Lakshmana MK, Araki W. The neurotoxicity of amyloid β -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. *Mol Brain*. 2017;10(1):4. doi: 10.1186/s13041-016-0284-5. 査読有
 17. Yamashita T, Aizawa H, Teramoto S, Akamatsu M, Kwak S: Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons. *Sci Reports* 7:39994, 2017. DOI: 10.1038/srep39994 査読有
 18. Shimizu M, Tozaka N, Ishii A, Mamada N, Terada M, Takuma H, Tamaoka A. Third nerve palsy due to local inflammation associated with vascular compression: A case series. *J Neurol Sci*. 2016;367:365-7. doi: 10.1016/j.jns.2016.06.048. 査読有
 19. Yamada K, Kobayashi H, Bo R, Takahashi T, Purevsuren J, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Ohkubo T, Yokota T, Watanabe M, Tsunemi T, Mizusawa H, Takuma H, Shioya A, Ishii A, Tamaoka A, Shigematsu Y, Sugie H, Yamaguchi S. Clinical, biochemical and molecular investigation of adult-onset glutaric acidemia type II: Characteristics in comparison with pediatric cases. *Brain Dev*. 2016;38(3):293-301. doi: 10.1016/j.braindev.2015.08.011. 査読有
 20. Isoo N, Ohno T, Isowaki M, Fukuda S, Murabe N, Mizukami H, Ozawa K, Mishina M, Sakurai M: The decline in synaptic GluN2B and rise in inhibitory neurotransmission determine the end of a critical period. *Sci Rep*. 2016; 6:34196. doi: 10.1038/srep34196. 査読有
 21. Oikawa T, Nonaka T, Terada M, Tamaoka A, Hisanaga S, Hasegawa M. α -Synuclein fibrils exhibit gain of toxic function, promoting tau aggregate and inhibiting microtubule assembly. *J Biol Chem* 2016; 291(29):15046-56. 査読有
 22. Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, Shirakura K, Kochi K, Shimazu R, and The Zonisamide PD Study Group: Randomized placebo-controlled trial of zonisamide in patients with Parkinson's disease. *Neurol and Clin Neurosci* 4(2016):10-15. 査読有

[学会発表](計 14 件)

1. Takashi Hosaka, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Naoki Hiroes, Akira Tamaoka, Shin Kwak: ADAR2-mediated A-to-I sites in extracellular RNAs as a biomarker of amyotrophic lateral sclerosis, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 26
2. Fumiko Yamamoto, Kaori Taniguchi, Naomi Mamada, Akira Tamaoka, Fuyuki Kametani, Madepalli K. Lakshmana, Wataru Araki: Enhancement of the autophagy-lysosomal pathway modulates the process of beta-amyloid generation, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 26
3. Yasushi Tomidokoro, Kazuhiro Ishii, Kazuhiro Irie, Akira Tamaoka: Toxic Abeta conformer and tau in CSF obtained from the cases of AD dementia, a preliminary study, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 25
4. Kazuhiro Ishii, Jyunko Itoh, Tomoyuki Masuda, Yasushi Tomidokoro, Naruhiko Sahara, Takeshi Ikeuchi, Akira Tamaoka: Altered expression of the Tau protein by organic arsenic compounds, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 24
5. Naoki Takegami, Hiroyuki Ishiura, Nobue K. Iwata, Hiroyuki Murai, Kyoko Yasaka, Hiroshi Takuma, Akira Tamaoka, Kishin Koh, Yoshihisa Takiyama, Shoji Tsuji, Tatsushi Toda, Jun Goto: Clinical and genetic analysis of three Japanese SPG3A families, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 23
6. Hosaka T, Yamashita T, Teramoto S, Hirose N, Tamaoka A, Kwak S: ADAR2-mediated RNA editing of extracellular linear and circular RNAs: a potential biomarker of amyotrophic lateral sclerosis. The 49th Annual Meeting Society for Neuroscience San Diego, Nov 3-7 (3), 2018
7. Hosaka T, Yamashita T, Hirose N, Teramoto S, Tamaoka A, Kwak S: ADAR2-mediated A-to-I sites in extracellular RNAs as a biomarker of amyotrophic lateral sclerosis. 第59回日本神経学会学術大会 札幌 23-26 (26) May 2018. 口演
8. 脳脊髄液中の $A\beta$ 毒性コンホマー量とタウの関連 . 富所 康志; 石井 一弘; 入江 一浩; 玉岡 晃 . 第 37 回日本認知症学会学術集会/2018-10-12--2018-10-14
9. 筋萎縮性側索硬化症における GDF-15 の検討 . 石井 亜紀子; 野原誠太郎; 遠坂直希; 三宅

- 善嗣; 奥根 祥; 玉岡 晃 . 第 4 回日本筋学会/2018-08-10--2018-08-11
10. Pathological examination of transmantle sign of FCD exhibiting T1-high-intensity on magnetic resonance imaging. Shioya Ayako; Kimura Yukio; Sato Noriko; Ikegaya Naoki; I...19th International Congress of Neuropathology/2018-09-23--2018-09-27
 11. Toxic Abeta conformer and tau in CSF obtained from the cases of AD dementia, a preliminary study . Yasushi Tomidokoro; 石井 一弘; Kazuhiro Irie; Akira Tamaoka . 第 59 回日本神経学会学術大会/2018-05-23--2018-05-26
 12. HNRNPA1 変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症の一家系 . 三宅善嗣; 石井 一弘; 野原誠太郎; 遠坂直希; 奥根祥; 武田勇人...第 59 回日本神経学会学術大会 /2018-05-23--2018-05-26
 13. 当院で診断した筋萎縮性側索硬化症に対するエダラボン治療体制とその課題討 . 遠坂直希; 武田勇人; 清水眸; 野原誠太郎; 森山哲也; 柳葉久美...第 59 回日本神経学会学術大会 /2018-05-23--2018-05-26
 14. パーキンソン病における認知機能障害と起立性低血圧の関連 . 渡邊 雅彦; 玉岡 晃 . 第 59 回日本神経学会学術大会/2018-05-23--2018-05-26

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：桜井 正樹

ローマ字氏名：SAKURAI, Masaki

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：（30162340）

研究分担者氏名：郭 伸

ローマ字氏名：KWAK, Shin

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院医学系研究科（医学部）

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：（40160981）

研究分担者氏名：玉岡 晃

ローマ字氏名：TAMAOKA, Akira

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号（8桁）：（50192183）

研究分担者氏名：塩谷 彩子

ローマ字氏名：Shioya, Ayako

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：講師

研究者番号（8桁）：（60622735）

研究分担者氏名：前川 裕美

ローマ字氏名：Maekawa, Hiromi

所属研究機関名：九州大学

部局名：農学研究院

職名：講師

研究者番号（8桁）：（80399683）

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：亀田 浩司

ローマ字氏名：KAMEDA Hiroshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。