

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591399  
 研究課題名（和文）蛍光標識二次元電気泳動法を用いた動脈管タンパク質の発現変動解析  
 研究課題名（英文）Proteomic analysis of ductus arteriosus by two-dimensional difference gel electrophoresis  
 研究代表者  
 羽山 恵美子（HAYAMA EMIKO）  
 東京女子医科大学・医学部・非常勤講師  
 研究者番号：00349698

研究成果の概要（和文）：動脈管は血中酸素の上昇に応じて収縮し肺動脈は拡張する。高酸素条件の動脈管でペルオキシレドキシシン 4 の発現量が増加した。ペルオキシレドキシシンは、血管拡張を促す Nf- $\kappa$ B の活性化を抑制することから、動脈管の収縮の維持や閉鎖に寄与する可能性がある。未熟児の動脈管の収縮・閉鎖機能は不十分である。胎仔の発達に伴って動脈管では reticulocalbin3 とトロポミオシン 2 の発現量が増加した。これらは平滑筋細胞の遊走能に関与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Increased  $P_{O_2}$  contracts ductus arteriosus (DA) and relaxes pulmonary artery (PA). One of up-regulated proteins in DA under oxygenated condition was determined as peroxiredoxin 4, which regulates NF- $\kappa$ B activity via a modulation of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation. Up-regulation of peroxiredoxin 4 in DA under oxygenated condition may contribute to the constriction of ductus arteriosus in response to change in the  $P_{O_2}$  level after birth. Functional DA closure depends on gestational maturity. One of up-regulated proteins in the term DA was determined as reticulocalbin 3. Another identified up-regulated protein was tropomyosin 2 involved in muscle contraction. These proteins may accelerate migration of the smooth muscle cells from media to subendothelial space in the term DA, which contributes anatomical closure of the DA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：タンパク質，シグナル伝達，動脈管，酸素感受性，プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

動脈管は胎性期の低酸素状態で開き、生後酸素に反応して収縮する。一方、肺動脈は胎生期低酸素状態で収縮しており、生後血中酸素分圧が上昇すると拡張する。動脈管と肺動

脈の酸素に対する反応の違いの機序は不明である。動脈管は数時間で自然に閉鎖するが、未熟児の場合は閉鎖せず開存したままのことがある。新生児の動脈管が閉じないと心疾患の原因になることから、動脈管の開閉制御

の機構を研究することの意味は大きい。周産期の動脈管の収縮・拡張の機構を調べることは、胎児循環生理の根本問題であるにもかかわらず、国内外での研究は少ない。

酸素は動脈管平滑筋細胞の酸化還元状態や活性酸素濃度を変えて、細胞膜表面のカリウム(K)イオンチャネルを閉じ、脱分極を起こし、カルシウム(Ca)チャネルを開き、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させる、細胞内小胞体からのCa<sup>2+</sup>の放出を増加させる、Rhoキナーゼの活性化を介し筋原線維のCa<sup>2+</sup>感受性を増加させる、ことにより動脈管を収縮させることがこれまでに報告されている。

(1) Kチャネル：Kチャネルには多くのファミリーがあるが、膜電位依存性Kチャネル(Kv)ファミリーには酸素感受性を示すメンバー(Kv1.2、1.5、2.1/9.3、3.1b、4.2、4.3)が報告されている。我々はブタ胎仔、新生仔の動脈管、肺動脈ではKv1.5及びそのアクセサリサブユニットのKvβ1.2が顕著に発現していることを報告した。新生児の肺動脈ではKvβ1.2の発現が低下、Kv1.5の発現が増大し、動脈管ではKvβ1.2の発現が増大していた。Kvβ1.2はKv1.5電流を抑制することから、新生児動脈管ではKvβ1.2によってKv1.5電流が抑制され、肺動脈では抑制が少ない状態であることが推定された。動脈管ではKvの抑制に伴いCaチャネルが開き、細胞内へCa<sup>2+</sup>が流入することから血管が収縮し、一方肺動脈では逆に拡張すると推定された(Hayama, Nakanishi. Pediatric Research, 2006)。

(2) Caチャネル：Caチャネルは細胞膜のG蛋白によって開閉が制御されているが、動脈管におけるCaチャネルの酸素感受性はまだ研究されていない。酸素化によって動脈管に発現しているα、β、γサブユニットの修飾をプロテオミクスによって解明する必要がある。

(3) 小胞体：平滑筋細胞では、細胞膜から流入するCa<sup>2+</sup>が小胞体に存在するリアノジン受容体を刺激しCa<sup>2+</sup>が放出される。またイノシトール3リン酸が筋小胞体よりのCa<sup>2+</sup>放出をうながすことにより、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇して平滑筋収縮が起こる。小胞体にはリアノジン受容体、Ca<sup>2+</sup>-ATPase、Calsequestrin、PhospholambanなどのCa<sup>2+</sup>結合タンパク質が存在し、Ca<sup>2+</sup>と結合して小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出やCa<sup>2+</sup>取り込みを制御している。動脈管細胞では酸素で小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出が増加する。肺動脈では逆に、低酸素で小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出が増加する。この差の機序は不明である。Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質は酸素濃度の増減によって修飾を受ける可能性があることから、プロテオミクスの手法によって解明する必要がある。

(4) 筋原線維Ca<sup>2+</sup>感受性：血管平滑筋の収縮は、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増加とは別に、筋原線維のCa<sup>2+</sup>に対する感受性増加によっても制御されている。即ち、GTP結合蛋白(GTP-Rho AやGTP-Rho B)はRhoキナーゼを活性化し、Rhoキナーゼの活性化はミオシン軽鎖ホスファターゼをリン酸化し、結果的にその活性を落とすことで、ミオシン軽鎖はリン酸化され、Ca<sup>2+</sup>に対する感受性が上がり、収縮がうながされる(Kajimoto, Nakanishi et al. Circulation 2006)。動脈管ミオシンは酸素によりCa<sup>2+</sup>に対する感受性が増加し、肺動脈では逆に低下する。その違いの機序は不明で、Rho、Rhoキナーゼに関するシグナル伝達系の酸素による修飾についてプロテオミクスによって解明する必要がある。

酸素の増減によって発現量や翻訳後修飾が変動するタンパク質は動脈管の酸素感受性に寄与する可能性が高い。しかし、これまでに動脈管・肺動脈の酸素感受性をターゲットとした網羅的プロテオミクスの研究はない。これは対象とする新生児や胎児の動脈管組織が極めて小さいことが大きな壁となっている。微量タンパク質の発現変動を検出可能にする蛍光色素を用いた蛍光標識二次元電気泳動法を用いれば、変動するタンパク質を敏感に検出することが可能である。

## 2. 研究の目的

本研究では、(研究1)動脈管及び肺動脈の酸素濃度の増減によって発現変動するタンパク質及び(研究2)胎仔の発達に伴って変動する大動脈、肺動脈、動脈管のタンパク質群を蛍光標識二次元電気泳動法及び質量分析計TOF/MSによるプロテオミクスの手法を用いて同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管試料の採取及び窒素/酸素処理

研究1：妊娠30日(満期)家兔胎仔の動脈管及び肺動脈を可及的速やかに採取し、実体顕微鏡下氷冷生理食塩液中で血液成分などの付着をできる限り除去し、Nakanishiら(Nakanishi T et al., 1993)の方法に従って、窒素(95% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>)又は酸素(95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>)飽和Krebs-Henseleit緩衝液中37℃で培養し、液体窒素を用いて急速凍結後-80℃に保存し分析試料とした。

研究2：妊娠30日(満期)、妊娠27日(早期)、妊娠21日(超早期)の家兔胎仔及び家兔新生仔(生後2日)から大動脈、肺動脈、動脈管を研究1と同様にして採取し、直ちに急速凍結し-80℃に保存した。

(2) 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法(2D-DIGE)による発現量の変動解析  
血管組織試料をプロテアーゼ阻害剤(Complete, Roche Molecular Biochemicals)

と脱リン酸化阻害剤を含む緩衝液によりホモジナイズした。8Mウレア、4%CHAPS、10mM Tris, pH 8.0を含む可溶化用緩衝液によりタンパク質を抽出可溶化した。研究1の抽出タンパク質試料は 50  $\mu$ gをそれぞれCy3又はCy5で最小標識し、非標識の抽出したタンパク質試料を加えてそれぞれ500  $\mu$ gとし、血管ごと一括して同一ゲル上で等電点 (pH 3-10)/SDS (10% アクリルアミド)二次元電気泳動を行った。研究2では、胎生21日、27日及び新生仔の各組織抽出タンパク質試料25  $\mu$ gをそれぞれIC-3-OSu (同仁化学研究所)、胎生30日の各組織抽出タンパク質試料25  $\mu$ gをそれぞれIC-5-OSu (同仁化学研究所) を用いて戸田らの蛍光標識法 (Tosifusa Toda et al. J Electrophoresis 2007;51:21-26) に準拠して実施した。同じ組織から抽出したタンパク質試料を、胎生21日 (IC-3) と胎生30日 (IC-5)、胎生27日 (IC-3) と胎生30日 (IC-5)、新生仔 (IC-3) と胎生30日 (IC-5) で混和し、等電点 (ZOOM Strips pH3-10 NL, Invitrogen)/10% SDS -PAGE (NuPAGE 10% Bis -Tris Gel IPG Well, Invitrogen) 二次元電気泳動を行った。

### (3) 質量分析用試料の調製と測定

二次元電気泳動法により分離されたタンパク質スポットを EXQuest Spot Cutter (バイオラド)を用いて切り出し、洗浄、ジチオスレイトールによる還元処理、ヨードアセトアミドによるアルキル化処理後、ゲル内トリプシン消化し、ZipTip (ミリポア)を用いて脱塩し濃縮して、測定用試料とした。マトリックスには、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid を使い、ターゲットには、MTP AnchorChip 600/484 を用いた。Autoflex II MALDI-TOF/TOF-MS (ブルカー・ダルトニクス)により質量分析を行った。検索ソフト (MASCOT) を用いたペプチドフィンガープリンティング法及びMS/MSの結果に基づいてタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

研究1：肺動脈試料の二次元電気泳動の結果を図1に示した。窒素処理条件で発現が増加したスポットが12個、高酸素条件で発現が増加したスポットが3個認められた。分子量の変動を示したスポットは2個であった。分子量の変動を示したスポットのうち、図中に矢印で示したタンパク質は質量分析の結果からトロポミオシンの一種と同定された。DA および PA の両試料において、窒素処理によりトロポミオシンの泳動速度は遅くなり、酸素処理によって泳動速度が速くなる傾向を示した。

動脈管試料の二次元電気泳動の結果を図2に示した。窒素処理で発現が増加したスポットが4個、高酸素条件で発現が増加したス

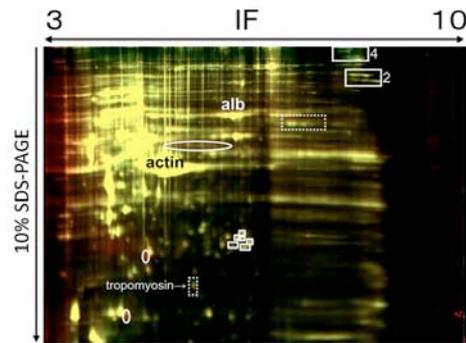


図1 窒素および酸素処理した肺動脈の二次元電気泳動  
楕円で囲ったスポットは、窒素処理で発現が増加したもの、長方形で囲ったスポットは、酸素処理で発現が増加したもの、破線で囲ったスポットは、分子量の変動したものを示す。図中の数字はスポットの数、Albはアルブミン、actinはアクチンを示す。

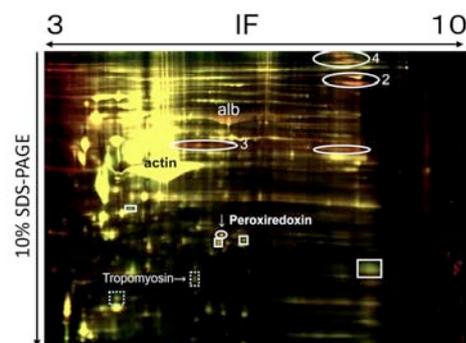


図2 窒素および酸素処理した動脈管の二次元電気泳動  
楕円で囲ったスポットは、窒素処理で発現が増加したもの、長方形で囲ったスポットは、酸素処理で発現が増加したもの、破線で囲ったスポットは、分子量の変動したものを示す。図中の数字はスポットの数、Albはアルブミン、actinはアクチンを示す。

ットが11個認められた。分子量の変動を示したスポットは2個あり、そのうち1つは、肺動脈でも同様の変動を示したトロポミオシンの一種であった。高酸素条件の動脈管で増加を示したタンパク質のうち、図中に矢印で示したタンパク質は質量分析の結果からペルオキシレドキシシン4と同定された。

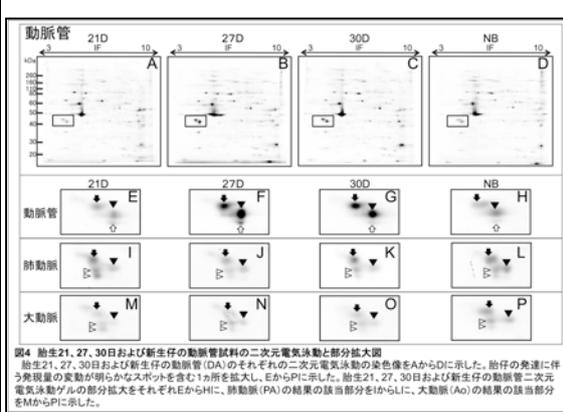
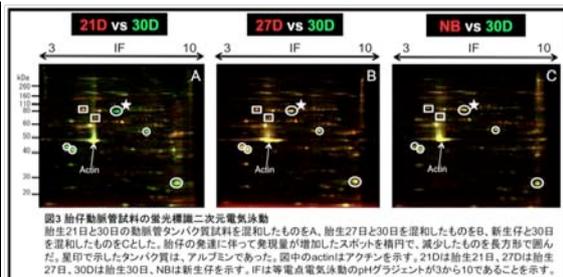
トロポミオシンは、アクチンと結合し筋肉の収縮・弛緩の調節を担う。刺激により平滑筋細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇すると、 $Ca^{2+}$ がトロポミオシンと結合し、トロポミオシンの構造が変化し、アクチンからトロポミオシンが外れ、ミオシンとアクチンの結合が生じて筋が収縮する。トロポミオシンの翻訳後修飾としてアセチル化が報告されている。アセチル化されたトロポミオシンはアクチンに結合しやすくなり、アクチンファイバーを補強し、アクチンのミオシンとの結合を通して筋収縮制御に寄与しているものと考えられている。また、アセチル化されたトロポミオシンは、アセチル化されていないものに比べてSDS-PAGEにおける泳動速度が速くなり、みかけの分子量に違いが生じる (Skoumpla K et al., 2007)。本研究におけるトロポミオシン

の分子量シフトは、アセチル化・非アセチル化されたトロポミオシンの量的変動を示している可能性がある。すなわち、酸素処理によって泳動速度が速くなる傾向が示されたことから、高酸素条件でこれらの血管のトロポミオシンのアセチル化が進む可能性がある。トロポミオシンのアセチル化が血管の収縮・弛緩に果たす役割についてはさらなる検討が必要である。

高酸素条件の動脈管で増加を示したタンパク質として、抗酸化作用をもつペルオキシレドキシシン4が見つかった。1時間の高濃度酸素の刺激により、動脈管においてはこのタンパク質が誘導されたことになる。ペルオキシレドキシシンは、抗酸化作用をもつ酵素であり、多くの組織・細胞の細胞質に豊富に存在し、活性酸素である過酸化水素や活性窒素であるペルオキシナイトライトを消去する作用をもつ。過酸化水素は、チロシンリン酸化酵素を始めとした多くのタンパク質のシステイン残基を酸化しタンパク質の機能を変えることにより、シグナル伝達に関与する (Rhee SU et al., 2005)。細胞質内の活性酸素が増えると、動脈管ではカリウムチャンネルが阻害され、動脈管が収縮すると報告されている (Reeve HL et al., 2001)。本研究においてペルオキシレドキシシンの増加が示されたことから、高酸素条件の動脈管では特異的に活性酸素である過酸化水素を除去する作用が活発であると推定される。ペルオキシレドキシシンには、炎症や免疫応答に関わる転写因子である Nf-kB の活性化を抑える作用が報告されている (Jin D-Y et al., 1997)。Nf-kB は酸化ストレス (過酸化水素) により活性化され、誘導型シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) や誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を誘導する (Panwalkar A et al., 2004)。ペルオキシレドキシシンが Nf-kB の活性化を抑え、その結果 Cox-2 や iNOS の誘導を抑制するならば、血管拡張作用が抑えられることになる。ペルオキシレドキシシンは生後の動脈管の収縮の維持や閉鎖に寄与する可能性がある。

研究 2：胎仔動脈管試料の蛍光標識二次元電気泳動の結果を図3に示した。胎生21日と30日試料を混和したものをA、胎生27日と30日試料を混和したものをB、新生仔と30日試料を混和したものをCとした。胎仔の発達に伴って発現量が増加したスポットを丸印で示し、減少したものを長方形で囲んで示した。増加したタンパク質の一つは、心血管試料のいずれにおいてもアルブミンであった。(図3ABCに星印で示した。)

胎生21、27、30日および新生仔の動脈管試料のそれぞれの二次元電気泳動パターンを図4のAからDに示した。動脈管、肺動脈、



大動脈の二次元電気泳動の結果から、胎仔の発達に伴って発現量の変動が明らかなスポットを含む1カ所を拡大し、図4のEからPに示した。動脈管では、黒矢印と黒三角で示した2つのスポットが、胎生21日や新生仔に比べて胎生27日と30日で増加していた。しかし、肺動脈や大動脈では大きな増減は観察されなかった。白矢印で示したスポットは動脈管でみられるが、肺動脈や大動脈ではみられなかった。一方、白三角で示した2つのスポットは肺動脈や大動脈では明瞭であるが、動脈管ではほとんど観察されなかった。黒矢印と黒三角で示したタンパク質は質量分析の結果から、それぞれEFハンドモチーフを持つCa結合タンパク質であるreticulocalbin3と筋収縮に関係する繊維構成タンパク質であるトロポミオシン2であった。胎児のアルブミンは胎児自身の肝臓で合成され、その産生量も胎児の発達と共に増加し、成人で一定値を保つ。血管試料からは極力血液成分を除去したが、太い血管の外膜にある小血管(脈管の脈管)などは除いていないので、その中に血液成分は残存している。動脈管・肺動脈・大動脈のいずれの試料でも胎生21日ではほとんどみられなかったアルブミンが、胎生27日以降では明瞭に観察されたことから、胎生21日の家兎胎仔ではアルブミンの合成が少ないと思われる。胎仔性アルブミンであるαfetproteinが検出されていることから、アルブミンよりαfetproteinが未熟胎仔では優勢なのかもしれない。動脈管の成熟に従って発現が増加する2つのタンパク質を質量分析法により帰属した。一つはreticulocalbin3であり、心筋や平滑筋に発現し、細胞内では小胞体内腔に分布する。

このタンパク質の詳しい生理的な機能はまだ知られていない。しかし、低浸潤製の乳癌細胞 (MCF-7) より高浸潤性の乳癌細胞 (MDA-MB-435) でより高発現であることから、細胞の遊走能に関与している可能性がある。

トロポミオシン 2 は筋の収縮に寄与する。平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞に高発現し、この遺伝子の変異はミオパチーの 1 種の原因となる。前立腺癌や高浸潤性の乳癌細胞 (MDA-MB-435)、食道扁平上皮癌で発現が高いこと、クラゲの単核の筋細胞では遊走が止まるとこのタンパク質をコードする転写物が激減することが報告されている。このタンパク質も細胞の遊走能に関係している可能性がある。満期胎児の動脈管では、血管内皮の肥厚と平滑筋細胞の遊走能の亢進があることから、これらの二つのタンパク質は血管平滑筋の遊走に関係している可能性が考えられる。胎生 21 日や新生仔の閉じた動脈管では、これらの発現量は低く大動脈や肺動脈並みになっていることから、満期胎児の動脈管に必要なタンパク質量の増加であると思われる。

まだ未同定であるが、動脈管 (白矢印) や肺動脈・大動脈 (白三角) に特異的に発現しているタンパク質も検出された。このように胎児の発達に伴うタンパク質の変動を詳細に検討することにより、特異的なタンパク質の発現情報を得て、胎児の血管発達のレベルを示すマーカータンパク質の発見や動脈管開存症などに対する新しい治療法の開発につなげたい。

本基盤研究により、成熟胎仔動脈管では、アクチン-ミオシン相互作用を制御するタンパク質 (トロポミオシン 2) の発現が高まり、Ca<sup>2+</sup>濃度依存の制御 (reticulocalbin3) を受け、ペルオキシレドキシンのような酸化還元状態に関係するタンパク質によりその機能が制御されているという図式を導きだすことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘, 胎児血管の収縮制御システムの発現変動解析, (財)日本心臓血圧研究振興会 (平成二十三年度研究業績集) 26 巻, 2012, 査読無 (掲載確定)
- ② 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘, 胎生期の動脈管を始めとした心血管におけるタンパク質発現の解析, (財)日本心臓血圧研究振興会 (平成二十二年度研究業績集), 25 巻, 17-21, 2011, 査読無
- ③ Toyoshima K, Momma K, Nakanishi T., In

vivo dilatation of the ductus arteriosus induced by furosemide in the rat, *Pediatric Research*, 67, 173-176, 2010, 査読有

- ④ Sun F, Hayama E, Katsube Y, Matsuoka R, Nakanishi T., The role of the large-conductance voltage -dependent and calcium -activated potassium (BK(Ca)) channels in the regulation of rat ductus arteriosus tone, *Heart & Vessels*, 25, 556-564, 2010, 査読有
- ⑤ 中西敏雄, 羽山恵美子, 松岡瑠美子, 勝部康弘, 肺動脈と動脈管における蛍光標識二次元電気泳動法を用いた酸素感受性蛋白質の発現変動解析, (財)日本心臓血圧研究振興会 (平成二十一年度研究業績集), 24 巻, 13-17, 2010, 査読無
- ⑥ Kazuo Momma, Katsuaki Toyoshima, Kiyomi Ito, Kiyoshi Sugiyama, Shinichiro Imamura, Fang Sun, Toshio Nakanishi, Delayed neonatal closure of the ductus arteriosus following early in utero exposure to indomethacin in the rat, *Neonatology*, 96, 69-79, 2010, 査読有

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 羽山恵美子, 中西敏雄, 胎仔発達に伴う肺動脈・動脈管の発現タンパク質の変化, 第 18 回日本小児肺循環研究会, 2012.2.4, 東京
- ② 羽山恵美子, 中西敏雄, Developmental Difference in Maturation of Sarcoplasmic Reticulum in the Large Blood Vessels Influences Their Contractility, American Heart Association Scientific Session, 2011.11.7, フロリダ, アメリカ合衆国
- ③ 羽山恵美子, 勝部康弘, 中西敏雄, Naturally Occurring L138Q Mutation in the Voltage-gated Potassium Channel 1.5 Impairs the Channel Activity, 第 75 回日本循環器学会, 2011.8.3-4, 横浜
- ④ 羽山恵美子, 勝部康弘, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル 1.5 の遺伝子多型における機能変化の検討, 第 47 回日本小児循環器学会, 2011.7.7, 福岡
- ⑤ 羽山恵美子, 中西敏雄, 肺動脈・動脈管の発達に伴う収縮制御に関する遺伝子群の発現変動, 第 17 回日本小児肺循環研究会, 2011.2.5, 東京
- ⑥ 羽山恵美子, 中西敏雄, 蛍光標識二次元電気泳動法を用いた肺動脈・動脈管酸素感受性蛋白質の検討, 第 46 回日本小児循環器学会, 2010.7.8, 東京
- ⑦ 羽山恵美子, 中西敏雄, 蛍光標識二次元

電気泳動法を用いた肺動脈・動脈管酸素感受性蛋白質の検索，第16回日本小児肺循環研究会，2010.2.6，東京

- ⑧ 羽山恵美子, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル 1.5 の glycosylation に関する検討, 第 82 回日本生化学会大会合同大会, 2009.10.12-14, 神戸
- ⑨ 羽山恵美子, 中西敏雄, ブタ新生仔大血管膜電位依存性カリウムチャンネル複合体の分離, 第 45 回日本小児循環器学会, 2009.7.15-17, 神戸
- ⑩ 勝部康弘, 孫芳, 羽山恵美子, 中西敏雄, 小川俊一, 家兎血管平滑筋における酸素感受性蛋白質 - iTRAQ2D-LC-MS/MS 法による解析 -, 第 45 回日本小児循環器学会, 2009.7.15-17, 神戸
- ⑪ 孫芳, 羽山恵美子, 中西敏雄, 先天性心疾患の拡張した大動脈では TGF-beta が発現している, 第 45 回日本小児循環器学会, 2009.7.15-17, 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

羽山 恵美子 (HAYAMA EMIKO)  
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：00349698

### (2) 研究分担者

中西 敏雄 (NAKANISHI TOSHIO)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90120013