

## 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25年 5月 30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650204

研究課題名（和文） 光穿孔による個体脳単一ニューロン遺伝子改変法の開発

研究課題名（英文） Targeted gene expression in single neurons by opto-poration in vivo

研究代表者

狩野 方伸 (KANO MASANOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40185963

研究成果の概要（和文）： 生きた動物個体の脳において、任意の神経細胞に光を用いて自由に遺伝子導入できる技術を開発する。フェムト秒パルスレーザーを用いて細胞膜の光穿孔を行うことで、広い範囲（500 ミクロン四方）に分布する多数（100 個程度）のニューロン一つ一つに独立に外来遺伝子を導入する。レーザー照射により、蛍光色素などの小分子を *in vivo* で個々のニューロンに選択的に導入することを確認した。DNA プラスミドを導入するための適切な条件検討の後に、遺伝子発現が可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）： We develop a novel method to introduce exogenous genes in individual neurons of interest in the intact brain. By using a mode-locked Ti:Sapphire laser, the neuronal membrane can be perforated to deliver small molecules including fluorescent dye and DNA plasmid. We have confirmed that fluorescent dye molecules could be reliably introduced into individual neurons in the intact mouse brains. After optimization of the technique, it is expected to be able to deliver DNA plasmid and targeted exogenous gene expression *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学／神経・筋肉生理学

キーワード：神経科学，2光子イメージング，遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

近年のめざましい遺伝子改変技術の進歩は、様々な生命現象の分子メカニズムの解明や疾患原因遺伝子の発見など、生命医学の発展に著しい貢献を果たして来た。脳機能の解明を目標とする神経科学研究においても、これらの技術を用いて数々の重要な発見がなされており、その有用性は述べるまでもない。特に、遺伝子改変マウスの作出やウイルスベクターを用いた時期・部位特異的遺伝子発現・抑制技術の登場によって、脳の機能発達

や機能局在の解析に欠かせないものとなっている。しかしながら、従来の遺伝子改変技術では動物個体全体もしくはかなり広い領域にある細胞の遺伝子を改変してしまうため、得られた結果が改変した分子の作用そのものによるものなのか、それとも広範囲の神経ネットワークの性質が変わってしまったために起こる二次的な変化なのかを区別することは原理的に極めて困難であり、解釈にも不確実な部分が大きく残ってしまうケースが多々見受けられる。そこで、我々は2光

子励起イメージング法を用いて、マウス個体脳内の単一ニューロンを可視化し、選択的に遺伝子を導入する方法を開発してきた (Kitamura et al., *Nature Methods*, 2008)。この方法では、2 光子励起顕微鏡で可視化したニューロン一つ一つに電気穿孔法によって外来遺伝子を導入するというものである。発現効率は約 70% と高いものの、脳内に刺入した電極を動かす必要があるため、遺伝子を導入できる細胞数 (20 個以下) や配置 (200  $\mu\text{m}$  以内) にかかなり制限があった。

## 2. 研究の目的

以上のような背景の下、本研究では、この困難を克服するために、2 光子励起に用いるフェムト秒レーザーを細胞膜の穿孔に用いることで、低侵襲かつ極めて高い自由度で脳内のニューロンへの遺伝子導入を可能にすることを目的とする。本研究で開発する光穿孔法を実現することで、個体脳においてより広い領域 (500  $\mu\text{m}$  以上) に 3 次元的に配置している、1 個から 100 個以上のニューロンに厳密に数を制御して遺伝子発現を行うことが可能となる。特に、これまでの遺伝子改変技術では細胞が発現する分子のプロモーター領域を用いることで特異的発現を実現するが、本研究の方法によれば、高い活動を示す細胞に遺伝子を導入するなど、これまで不可能であった実験を可能にすると期待される。

光穿孔法による遺伝子導入は、これまでに培養上皮細胞などの例がわずかに報告されているのみで、動物個体に適用された例は世界的に見ても全くない。我々が最近開発した 2 光子イメージングによる単一細胞電気穿孔法によって初めて、動物個体脳で個々のニューロンへの遺伝子導入が可能になったばかりである。本研究で開発する、動物個体脳での光穿孔法が成功すれば、従来法による効率を大幅に向上させることが可能であり、極めて大きな技術的進歩になることは間違いない。動物個体の脳における特異的遺伝子改変技術については、トランスジェニックマウスの作製、ウイルスによる発現、子宮内電気穿孔法などが一般的であり、すべての方法がニューロンの分子発現パターンの特異性に基いている。また、活動依存的な遺伝子発現法については Fos や Arc のプロモーターを用いるものがあるが、それらがどのような神経活動によるものなのかは明らかになっていない。本研究で開発する方法を用いれば、個々のニューロンの活動を直接可視化した上で、そのニューロンに外来遺伝子を導入することが可能になるという点で極めて新規性が高い方法である。

本研究で提案する、光穿孔による選択的遺伝子改変法は、これまでのトランスジェニッ

ク動物の作出等、多数のニューロンの遺伝子を改変した平均的な性質の変化でしか捉えることのできなかつた細胞機能や形態変化を個々のニューロンのレベルで直接解析できる点に最大の特色がある。形態解析ひとつを例に取ってみても、これまでの多ニューロン標識では、どの構造がどの細胞に属するかを膨大な連続切片の再構成によって解析するという非常に困難な作業が必要であったが、生きた動物個体内で目的のニューロンだけを効率よく標識することができれば、これらの解析にかかる時間と労力を飛躍的に軽減することが可能となる。また、ノックアウトマウスの解析などでは、発生発達期から目的の遺伝子が欠損しているために正常な神経回路を構築することができないか、もしくは神経回路の性質が著しく変化してしまい、成熟動物における目的分子の機能を正しく評価できない場合も多い。その点、本研究で提案する方法が特に成熟動物において確立できれば、これまで技術的に全く不可能で、問いを発することすらできなかった問題について詳細な解析を行うことが可能となり、その波及効果は計り知れない。また、動物への遺伝子導入から発現の確認、機能解析までにかかる時間を顕著に短縮できることから、これまで細胞培養系などでしか行うことのできなかつた、機能分子の大規模なスクリーニングを生きた動物個体の脳内で行うことが可能になると期待される。さらに、2 光子カルシウムイメージングで個々のニューロンの活動を観察した後に、活動性の高いニューロンだけを標識したり、そのニューロンの活動を制御する分子を導入することで、これまでその複雑さから解析することが極めて困難であった大脳皮質の局所神経回路について、その構造と機能を生きた動物の脳において直接可視化・操作することで明らかにできる。このことは、分子の発現プロモーターを利用する従来の遺伝子改変技術では実現不可能であり、本研究で開発する技術を用いることで初めて可能になる。このように、本研究は神経科学研究において大きなブレイクスルーとなると期待される。

## 3. 研究の方法

全ての実験は、東京大学医学部動物実験委員会が実験計画の承認を受けた上で、関連法規に則って行った。組み換え DNA を用いた実験は、東京大学医学部組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けた上で、関連法規に則って行った。

2 光子顕微鏡に用いる、フェムト秒パルスレーザーを用いて、動物個体脳内の個々のニューロンに光照射することで、細胞膜に小孔を穿ち DNA プラスミドを細胞内に導入する方法を開発する。まず、個体脳における光

穿孔を行う前に、スライス標本において光穿孔が可能な条件を見いだす。2光子励起顕微鏡に使用するモードロック式チタンサファイアレーザーからの高光密度フェムト秒パルスを、ニューロンの細胞膜に短時間 (<20msec) 照射することで、ナノメートルオーダーの孔を細胞膜に穿ち、あらかじめ細胞外液に混合しておいた蛍光色素や DNA プラスミドなどの小分子をニューロンに取り込ませる。導入する遺伝子としては蛍光タンパク質をコードするプラスミド (pEGFP-C1 等) を用い、光穿孔から 24 時間後に 2 光子励起顕微鏡にて、GFP の発現を確認する。発現効率が最大となるように、光学系 (対物レンズの開口数、レーザーのパルス幅)、レーザーパワー、光照射時間、光照射面積、プラスミド濃度などの条件検討を行った。

In vivo における光穿孔では、大脳皮質第 2 / 3 層ニューロンを対象とし、まず、内液に DNA プラスミドを含むガラス電極を刺し入れて弱い圧力をかけることで、脳内の細胞外領域に DNA プラスミドを注入する。電極内液に蛍光色素を含めておくことで細胞外領域を蛍光色素で満たし、個々のニューロンは「影」として観察する。但し、ここでは、電気穿孔法の場合と異なり、ガラス電極を個々のニューロンに近づける必要はなく、すなわち、電極を脳内で動かす必要がないため、侵襲は最小限に抑えられる。

#### 4. 研究成果

まず、光穿孔による遺伝子導入を行う前に、レーザーを用いて外来分子をニューロンに導入できるかどうかの確認を行なった。細胞膜を透過しない蛍光分子を細胞外に満たし、細胞膜付近でパルスレーザーを照射した。その結果、脳スライス標本および個体脳において光照射したニューロンに選択的に蛍光分子が取り込まれることが確認された。強い光を照射することによるニューロンへのダメージが起らないかどうかを確認するため、蛍光デキストランを光照射により導入し、24 時間後に再度観察したところ、ニューロンの形態に異常は見られず、光照射によるダメージによりニューロンの細胞死などは起らないことが確認された。

次に、DNA プラスミドの導入を試みた。光照射によるダメージを蛍光デキストランによって確認した際は、ニューロンの形態に異常は見られず、光照射によるダメージによりニューロンの細胞死などは起らないことが確認されたが、DNA プラスミドの導入では、24~48 時間後では発現を確認できなかった。原因として DNA プラスミド溶液の濃度、光照射の条件などが考えられるため、これらの条件を最適化する必要があるとともに、用いるプロモーターや手術法を改良す

ることで、外来遺伝子の導入効率を上げることが可能であると考えられる。また、光穿孔を効率的に行うためには、脳表面を露出させる必要があるが、このための手術により脳内におけるニューロンの状態が急性的に変化して、光穿孔のダメージに対して弱くなっている可能性も考えられる。手術による出血を最小限に抑えるとともに、抗炎症剤やステロイドの投与などでこれらの影響を極力少なくする工夫が必要であると考えられた。

#### 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 16 件)

- (1) Kano, M., Nakayama, H., Hashimoto, K., Kitamura, K., Sakimura, K. & Watanabe, M. Calcium-dependent regulation of climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Physiol.* in press. 査読有
- (2) Kitamura, K. & Kano, M. Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. *Neural Networks* published online (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0893608012002110>) (2012). 査読有
- (3) Sugaya, Y., Cagniard, B., Yamazaki, M., Sakimura, K. & Kano, M. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol negatively regulates habituation by suppressing excitatory recurrent network activity and reducing long-term potentiation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 33, 3588-3601 (2013). 査読有
- (4) Hira, R., Ohkubo, F., Ozawa, K., Isomura, Y., Kitamura, K., Kano, M., Kasai, H. & Matsuzaki, M. Spatiotemporal Dynamics of Functional Clusters of Neurons in the Mouse Motor Cortex during a Voluntary Movement. *J. Neurosci.* 33, 1377-1390 (2013). 査読有
- (5) Nakayama, H., Miyazaki, T., Kitamura, K., Hashimoto, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Sakimura, K., Watanabe, M. & Kano, M. GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384-396 (2012). 査読有
- (6) Uesaka, N., Mikuni, T., Hashimoto, K., Hirai, H., Sakimura, K. & Kano, M. Organotypic coculture preparation for the study of developmental synapse

- elimination in mammalian brain. *J. Neurosci.* 32, 11688-11699 (2012). 査読有
- (7) Tanimura, A., Uchigashima, M., Yamazaki, M., Uesaka, N., Mikuni, T., Abe, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M. Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 12195-12200 (2012). 査読有
- (8) Kano, M. & Watanabe, M. Synaptogenesis and synaptic elimination. *Handbook of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. in press (2012).
- (9) Takahashi, N., Kitamura, K., Matsuo, N., Mayford, M., Kano, M., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. Locally synchronized synaptic inputs. *Science* 335, 353-356 (2012). 査読有
- (10) 喜多村和郎, 橋本浩一, 狩野方伸. 小脳プルキンエ細胞樹状突起活動の in vivo イメージング. *生体の科学* 63, 26-33 (2012). 査読無
- (11) Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Yamazaki, M., Abe, M., Usui, H., Kano, M., Sakimura, K. & Watanabe, M. CaV2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 32, 1311-1328 (2012). 査読有
- (12) Watanabe, M. & Kano, M. Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1697-1710 (2011).
- (13) Ichikawa, R., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Konno, K., Hashimoto, K., Tatsumi, H., Inoue, Y., Kano, M. & Watanabe, M. Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 31, 16916-16927 (2011). 査読有
- (14) Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki, M., Shin, H.-S., Watanabe, M., Sakimura, K. & Kano, M. Postsynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2447-2457 (2011). 査読有
- (15) Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M. & Kasai, H. In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Physiol.* 589, 2447-2457 (2011). 査読有
- (16) Miyata, M., Kishimoto, Y., Tanaka, M., Hashimoto, K., Hirashima, N., Murata, Y., Kano, M. & Takagishi, Y. A role for myosin Va in cerebellar plasticity and motor learning: a possible mechanism underlying neurological disorder in myosin Va disease. *J. Neurosci.* 31, 6067-6078 (2011).
- [学会発表] (計 3 1 件)
- (1) 喜多村和郎、狩野方伸. マウスバレル皮質における感覚シナプス入力の可視化. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日. 東京
- (2) 堤新一郎、多田真弓、崎村建司、喜多村和郎、狩野方伸. マウス小脳における登上線維応答の同期性と AldolaseC 発現パターンとの関連. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日. 東京
- (3) Jean-Marc Good, Kazuo Kitamura, Kenji Sakimura, Masanobu Kano. Climbing fiber network refinement and desynchronization of Purkinje cell population activity during postnatal cerebellar development. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日. 東京
- (4) 上阪直史、三國貴康、平井宏和、狩野方伸. 組織培養法と細胞種特異的遺伝子導入法を用いたシナプス刈り込みのメカニズム. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日. 東京
- (5) 菅谷佑樹、山崎真弥、崎村建司、狩野方伸. 内因性カンナビノイド 2-アラキドノイルグリセロールは歯状回の興奮性シナプス伝達を抑制し発作を減弱する. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日. 東京
- (6) 川田慎也、橋本浩一、山崎真弥、宮崎太輔、山崎美和子、三國貴康、渡辺雅彦、崎村建司、狩野方伸. 小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの発達において競合する登上線維間の相対的な強度の差と登上線維の絶対的な強度がそれぞれ異なる段階に寄与している. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日. 東京
- (7) Kano, M. Activity-dependent Refinement of Climbing Fiber to

- Purkinje Cell Synapses during Postnatal Cerebellar Development. International Symposium on "Sensory Systems and Neural Circuits" Celebrating the 22nd Anniversary of Odorant Receptor Gene Discoveries. 2013年2月11日. 東京
- (8) A. TANIMURA, M. UCHIGASHIMA, M. YAMAZAKI, N. UESAKA, T. MIKUNI, K. HASHIMOTO, M. WATANABE, K. SAKIMURA, M. KANO. Synapse type-independent degradation of 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression in the cerebellum. Neuroscience 2012 2012年10月13日~17日. New Orleans, USA.
- (9) T. MIKUNI, N. UESAKA, H. OKUNO, H. HIRAI, H. BITO, M. KANO. Possible involvement of the Ca<sup>2+</sup>-dependent gene Arc in activity-dependent synapse elimination in the cerebellum. Neuroscience 2012 2012年10月13日~17日. New Orleans, USA.
- (10) T. KAWASHIMA, K. KITAMURA, K. OHKI, K. SUZUKI, M. NONAKA, S. KAMIJO, S. TAKEMOTO-KIMURA, M. KANO, H. OKUNO, H. BITO. Visualization of an active ensemble of cortical neurons in vivo using a novel activity-dependent promoter E-SARE. Neuroscience 2012 2012年10月13日~17日. New Orleans, USA.
- (11) R. LY, V. UEBELE, J. RENGER, H. PROSSER, A. RANDALL, M. KANO, K. SAKIMURA, B. BARBOUR, P. ISOPE, A. FELTZ. Electrical contribution of postsynaptic T-type calcium channels to parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission. Neuroscience 2012 2012年10月13日~17日. New Orleans, USA.
- (12) Y. UEDA, S. R. OKAZAKI, K. YAMANAKA, K. ENOMOTO, M. KANO, M. KIMURA. Impairment of reward-based adaptive choice of actions by local injection of cannabinoid CB1 receptor antagonist into the striatum of behaving monkeys. Neuroscience 2012 2012年10月13日~17日. New Orleans, USA.
- (13) Kano, M. Calcium-dependent regulation of climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. Satellite symposium of SFN 2012 meeting. 2012年10月12. New Orleans, USA.
- (14) Kano, M. Retrograde suppression of synaptic transmission by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. Cell Symposia. 2012年10月11日. New Orleans, USA.
- (15) Jean-Marc Good, Kazuo Kitamura, Kenji Sakimura, Masanobu Kano. Postnatal climbing fiber synapse remodeling desynchronizes population activity of Purkinje cells in developing cerebellum. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日.名古屋
- (16) 川島 尚之、喜多村 和郎、大木 研一、鈴木 敢三、野中 美広、上條 諭志、竹本 さやか、狩野 方伸、奥野 浩行、尾藤 晴彦. 新規活動依存的プロモーター E-SARE を用いた、大脳皮質における機能的回路の同定. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日.名古屋
- (17) 鳴島 円、内ヶ島 基政、橋本 浩一、饗場 篤、渡辺 雅彦、宮田 麻理子、狩野 方伸. 発達期マウス網膜—外側膝状体シナプス除去における代謝型グルタミン酸受容体1型の役割. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日.名古屋
- (18) 狩野 方伸. 発達期小脳におけるシナプス除去カルシウム依存性調節. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日.名古屋
- (19) Kano, M. Control of synaptic function by endogenous cannabinoid. Plenary Lecture at the 8th FENS Forum of European Neuroscience. 2012年07月16日. Barcelona, Spain.
- (20) Kazuo Kitamura, Yuji Ikegaya, Masanobu Kano. Heterogeneous organization of individual synaptic inputs in the mouse barrel cortex. FENS Forum 2012 2012年7月14日~18日. Barcelona, Spain.
- (21) Hira R., Ohkubo F., Ozawa K., Isomura Y., Kitamura K., Kano M., Kasai H. & Matsuzaki M. Spatial And Temporal Structure Of Cortical Microcircuit Activity For Generating Voluntary Movement. FENS Forum 2012 2012年7月14日~18日. Barcelona, Spain.
- (22) Kano, M. Refinement of Climbing Fiber to Purkinje Cell Synapses during Postnatal Cerebellar Development. 1st International Symposium / 59th NIBB Conference. 2012年3月11日. 岡崎
- (23) Kano, M., Hashimoto, K., Kawamura, Y., Nakayama, H., Kitamura, K.,

- Sakimura K. Activity-dependent refinement of climbing fiber to Purkinje cell synapses during postnatal cerebellar development. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCE: "Assembly, Plasticity, Dysfunction and Repair of Neural Circuits". 2011年10月19日. 蘇州、中国
- (24) Kano, M. Activity-dependent maturation of climbing fiber to Purkinje cell synapses during postnatal cerebellar development. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum. 2011年9月18日. 東京
- (25) Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki M., Shin, H-S, Watanabe M., Sakimura K., Kano, M. Postsynaptic P/Q type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel is involved in refinement of cerebellar climbing fiber to Purkinje cell synapses in early postnatal development. 第34回日本神経科学大会 2011年9月14日～17日. 横浜
- (26) Mikuni, T., Uesaka, M., Kano, M. Roles of Purkinje cell activity in climbing fiber synapse elimination in an organotypic coculture preparation of the cerebellum and medulla oblongata. 第34回日本神経科学大会 2011年9月14日～17日. 横浜
- (27) Miki Hashizume, Kazuo, Kitamura, Kenji Sakimura and Masanobu Kano. Enhanced synchrony of climbing fiber-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in cerebellar Purkinje cells caused by elevated synchronous activity of inferior olivary neurons in GluR $\delta$ 2 (GluR $\delta$ 2) knockout mouse. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月14日～17日. 横浜
- (28) Good, J.K., Kitamura, K., Kano, M. Desynchronization of cerebellar Purkinje cell population activity during postnatal development. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月14日～17日. 横浜
- (29) Kano, M. Activity-dependent synapse elimination during postnatal development. Gordon Research Conference on Cerebellum. 2011年8月24日. New London, USA
- (30) Narushima, M., Uchigashima, M., Hashimoto, K., Aiba, A., Watanabe, M., Miyata, M., Kano, M. Requirement of

type 1 metabotropic glutamate receptor for experience-dependent pruning of retinogeniculate synapses. 8th IBRO World Congress 2011年7月14日～18日. Florence, Italy.

- (31) Kano, M. Activity-dependent refinement of climbing fiber to Purkinje cell synapses during postnatal development. Symposium on Organization and Function of Neuronal Circuits in Movement Control. 2011年5月28日. Trolleholm Castle, Sweden

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

狩野 方伸 (KANO MASANOBU)  
 東京大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：40185963

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし