

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590120

研究課題名(和文)ニコチン性アセチルコリン受容体を介する炎症・免疫調節機構の検討

研究課題名(英文) Investigation on the role of nicotinic acetylcholine receptors in regulation of inflammatory and immune responses

研究代表者

川島 紘一郎 (KAWASHIMA, Koichiro)

北里大学・薬学部・客員教授

研究者番号：70095008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規 $\alpha 7$  nAChR内因性リガンドSLURP-1の免疫組織における発現とT細胞機能に及ぼす作用、およびニコチンのT細胞分化に及ぼす作用を検討した。免疫組織化学によってヒト扁桃濾胞周辺部のCD205+樹状細胞(DCs)におけるSLURP-1の局在を発見した。SLURP-1は、ヒトT細胞系白血病細胞株MOLT-3と末梢血単核球の増殖を抑制し、ACh産生を増強した。ニコチンは、Th0から制御性T細胞への分化を抑制し、Th1への分化を促進した。以上より、SLURP-1は、抗原提示反応においてAChの作用を増強してT細胞の機能的分化を促進し、Th0分化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the current project, we investigated the localization of SLURP-1, an endogenous allosteric ligand for  $\alpha 7$  nAChRs, in immune organs and its role in regulation of T cell function together with effects of nicotine on T cell differentiation. Using immunohistochemical techniques, we found specific SLURP-1 localization in CD205-positive dendritic cells residing in the marginal zone of the human tonsil. SLURP-1 attenuated the growth of human leukemic T cell line MOLT-3 cells and human blood mononuclear cells (MNLs), but increased ACh synthesis in these cells, suggesting facilitation of functional development of T cells by SLURP-1. Nicotine suppressed differentiation of Th0 cells to Tregs, but facilitated to Th1 in mouse spleen MNLs, suggesting a role for nAChRs in T cell differentiation. These results suggest that SLURP-1 plays a role in T cell development and differentiation during antigen presentation through stimulation of  $\alpha 7$  nAChRs.

研究分野：薬理学

キーワード：アセチルコリン ニコチン受容体 T細胞 樹状細胞 Th0 SLURP-1 Th1  $\alpha 7$

## 1. 研究開始当初の背景

アセチルコリン (ACh) は、現在では重要な神経伝達物質の一つとして広く認識されている。1914年に麦角抽出物に含まれる血圧降下物質を追跡していた AJ Ewins は、ACh が混在していることを発見した。この報告を受けて、HH Dale は、1914年に ACh を始めとする種々のコリン誘導体が、運動神経、自律神経節前線維および副交感神経節後線維を刺激した時と同様なニコチン様およびムスカリン様作用を示すことを発見した。しかし、動物体内における ACh の存在は確認されていなかったことから、Dale は ACh が神経伝達物質であると宣言するのを躊躇していた。1921年に O Loewi は、二つのカエル摘出心標本を巧みに組み合わせた実験系を考案した。迷走神経を電気刺激した摘出心の灌流液が、他方の摘出心の収縮力を抑制することを発見し、Loewi は灌流液には迷走神経から放出された Vagusstoff が含まれていると報告した。さらに、1926年に Loewi と Navratil は、薬理学的に Vagusstoff は ACh であることを証明した。1929年に Dale と Dudley は、動物体内における最初の ACh の発見となったウシとウマの脾臓からの ACh の化学的単離に成功した。これらの経緯から、1935年に Dale は、ACh を伝達物質とする運動神経、自律神経節前線維、および副交感神経節後線維をコリナージック、アドレナリン様物質を伝達物質とする交感神経節後線維をアドレナジックと呼ぶことを提唱した。1936年に HH Dale と O Loewi は、神経刺激の化学伝達を証明した功績によってノーベル生理学賞を受賞した。中枢神経系における ACh の発見は1938年以降になってからである。

その後、数十年間にわたって脾臓の ACh の起源と役割に関する研究は行われていなかった。現在の定説では、脾臓への副交感神経支配は確認されていない。従って、Dale と Dudley が脾臓で発見した ACh は非神経性由来ということになる。我々は、血中における ACh の存在を証明し、その起源がリンパ球であることを発見した。さらに CD4<sup>+</sup>T 細胞における ACh 合成酵素 (ChAT) の遺伝子と蛋白質の発現を発見した。これらの知見は、脾臓の ACh の起源はリンパ球であることを証明するものである。リンパ球を始めとする免疫細胞には種々のムスカリン性およびニコチン性 ACh 受容体 (それぞれ、mAChRs および nAChRs) が発現しており、T 細胞が産生・遊離した ACh が免疫機能調節に関与している可能性が考えられる。実際に、mAChR と nAChR 作用薬により、免疫細胞において様々な機能的および生化学的変化が引き起こされる。

最近、 $\alpha 7$  nAChR 刺激が、マクロファージなどの免疫細胞における TNF- $\alpha$  などの炎症促進性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症作用を示すことが注目されている。我々は、 $\alpha 7$  nAChR ノックアウト ( $\alpha 7$ -KO) マウスを用いて、免疫刺激による抗体産生を  $\alpha 7$  nAChR が抑制

的に制御していることを発見した。さらに  $\alpha 7$  nAChR に対する陽性アロステリック・リガンドとして作用する内因性ペプチド SLURP-1 が発見され、T 細胞の活性化に関与している可能性が報告されている。我々は、すでに胸腺と脾臓における SLURP-1 の遺伝子発現を確認している。これらの知見から、SLURP-1 が T 細胞を始めとする種々の免疫細胞上の  $\alpha 7$  nAChR を刺激して、免疫および炎症反応の調節に関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、SLURP-1 の免疫機能調節への関与を証明し、また nAChR のナイーブ T 細胞 (Th0) の分化における役割を明らかにする目的で、1) 免疫組織化学的手法を用いて、ヒト免疫組織における SLURP-1 発現、2) T 細胞のモデルとしてヒト T 細胞系白血病細胞株 MOLT-3 と末梢血単核球 (MNLs) を用いて、SLURP-1 の細胞増殖と ACh 合成に及ぼす作用、3) ニコチンの Th0 の Th1, Th2, あるいは制御性 T 細胞 (Treg) への分化に及ぼす作用を検討した。

## 3. 研究の方法

1) ヒト扁桃における SLURP-1 発現の免疫組織化学的検討。

特定非営利活動法人エイチ・イー・ピー (HAB) 研究機構から倫理問題をクリアした凍結ヒト扁桃組織を入手した。常法により 4% パラホルムアルデヒドで固定後に、凍結包埋して厚さ 10  $\mu$ m の組織切片を作製した。

一次抗体: ヒツジ抗ヒト型 SLURP-1 抗体 (R&D Systems), マウス抗ヒト CD205 モノクローナル抗体 (MG38, AbD Serotec), ラット抗ヒト CD4 モノクローナル抗体 (YNB46.1.8, Abcam) を使用した。二次抗体: それぞれの一次抗体に対する Alexa Fluor 488, または Alexa Fluor 555 標識抗体を使用して常法により染色した。

操作: 一次抗体と組織切片を 4 にて一晩反応させた。洗浄後、それぞれの二次抗体と組織切片を 1 時間反応させた。さらに、DAPI を用いて、細胞核を対比染色した。共焦点顕微鏡で免疫染色像を観察した。一部の切片では、ヘマトキシリン・エオジン (HE) による染色を行った。

パーオキシデース法: ヒツジ抗ヒト型 SLURP-1 抗体と一晩反応させた後に、一部の組織切片を、ビオチン標識ロバ抗ヒツジ IgG 抗体と 1 時間反応させた。定法により Vector 社の ABC Kit を用いて反応させた後に、DAB 反応液にて発色させて光学顕微鏡にて観察した。

2) SLURP-1 の T 細胞機能に及ぼす作用の検討。

細胞: 株式会社ケー・イー・シー (KAC) から入手した倫理問題をクリアしたヒト末梢血単核白血球 (MNLs) と、T 細胞のモデルとして白血病細胞株 MOLT-3 を使用した。

rSLURP-1: Abnova 社より購入した組み換えヒト型 rSLURP-1 を使用した。

操作: 7%ウシ胎児血清と AChE 阻害薬 DFP (1  $\mu$ M) を含む RPMI 1640 培地中で,  $5 \times 10^5$  個の MOLT-3 または MNLs をフィットヘマグルチニン(PHA), rSLURP-1 (0.5  $\mu$ g/mL), または  $\alpha 7$  nAChR 特異的阻害薬メチルリカコニチン (MLA, 100 nM) の存在下, あるいは非存在下で 48 時間培養した。細胞増殖: ヘマトサイトメーターとトリパンブルーを用いて, 生存細胞数を培養前後で計測した。コリン作動系活性: MOLT-3 および MNLs の ACh 含量と培養上清中への ACh 分泌量をラジオイムノアッセイ法により測定した。MOLT-3 から mRNA を抽出して RT-PCR 法により, SLURP-1 の ChAT 遺伝子発現に及ぼす作用を検討した。

3) ニコチンの T 細胞分化に及ぼす作用の検討。

細胞培養: 5~8 歳の C57BL/6J マウスから脾臓を摘出し, 常法により脾細胞を分離した。Red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich) を用いて, 脾細胞から赤血球を除去し, 密度勾配法によりナイーブ T 細胞 (Th0) を含む MNLs 分画を調製した。1.0  $\times 10^7$  個の MNLs を 12-well プレートで, 10% FBS, ペニシリン (100 units/mL), ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/mL) および 2-mercaptoethanol (50 mM) を含む RPMI1640 培地中で培養した。一部に T 細胞を刺激するために, anti-CD3 mAb (0.1  $\mu$ g/mL) および anti-CD28 mAb (1  $\mu$ g/mL) を添加した。さらに一部にニコチン (500  $\mu$ M) を添加して nAChRs を刺激した。これらの MNLs を 37, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4~5 日間培養した。

フローサイトメトリーによる T 細胞分化の測定: 培養液を 0.1% BSA を含むハンクス緩衝液に置換した後に, Treg 発現を調べるために, 蛍光色素標識したマウス抗原に対する各種の抗体 (FITC-CD4, APC-CD8, PE-CD25, APC-Foxp3: eBioscience) を用いて培養 MNLs を染色した。Th1 発現を調べるために, Golgi Stop (BD Biosciences), phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/mL, Sigma) およびイオノマイシン (500 ng/mL) を用いて MNLs を 4 時間刺激した。その後 T 細胞の IFN- $\gamma$  を抗サイトカイン抗体 (APC-IFN- $\gamma$ , eBioscience) を用いて染色した。Treg および Th1 発現量を FACSCalibur フローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン製) を用いて測定し, CELLQuest Pro により解析した。

#### 4. 研究成果

1) ヒト扁桃 CD205 陽性樹状細胞 (DCs) における SLURP-1 発現の発見。

ヒト扁桃のリンパ濾胞周辺部と少数のリンパ濾胞内に散在する複雑な形態をもつ細胞が SLURP-1 陽性反応 (SLURP-1+) を示した (図 1A)。SLURP-1+ 細胞の形態から DCs であることを推定して, 成熟 DCs に発現する CD205 に対す

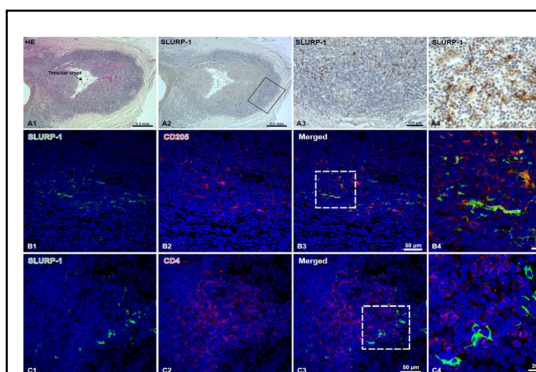


図 1. ヒト扁桃における SLURP-1, CD205 および CD4 発現の免疫染色像。A1:ヘマトキシリン・エオジン染色像 (低倍率)。A2:アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法による SLURP-1 免疫染色像。A3:指定部位の拡大像。A4:強拡大像。SLURP-1+反応が DC 様構造の細胞に見られる。B1:扁桃における SLURP-1 の免疫染色像 (低倍率)。B2: CD205 の免疫染色像。B3: SLURP-1 と CD205 の共免疫染色像。B4:指定部位の強拡大像。一部の SLURP-1+細胞が CD205+反応を示している。C1: 扁桃における SLURP-1 の免疫染色像 (低倍率)。C2: CD4 の免疫染色像。C3: SLURP-1 と CD4 の共免疫染色像。C4:指定部位の強拡大像。SLURP-1+細胞は CD4+T 細胞に囲まれている。

る抗ヒトCD205モノクローナル抗体を用いて免疫染色した。その結果, 約50%のSLURP-1+細胞がCD205+反応を示した (図1B)。これらの結果から, 成熟CD205+DCsがSLURP-1を発現していることが確認された。

抗CD4モノクローナル抗体を用いて, ヒト扁桃内における T 細胞と SLURP-1+DCs の分布を 検討した。一部の CD4 陽性 (CD4+) T 細胞は, SLURP-1+DCs と近接していることが判明した (図 1C4)。

以上の知見は, 抗原提示反応において, 自己および DCs を含む様々な免疫細胞上に発現する  $\alpha 7$  nAChR において T 細胞から遊離された ACh の作用を, SLURP-1 が増強する可能性を示唆している。

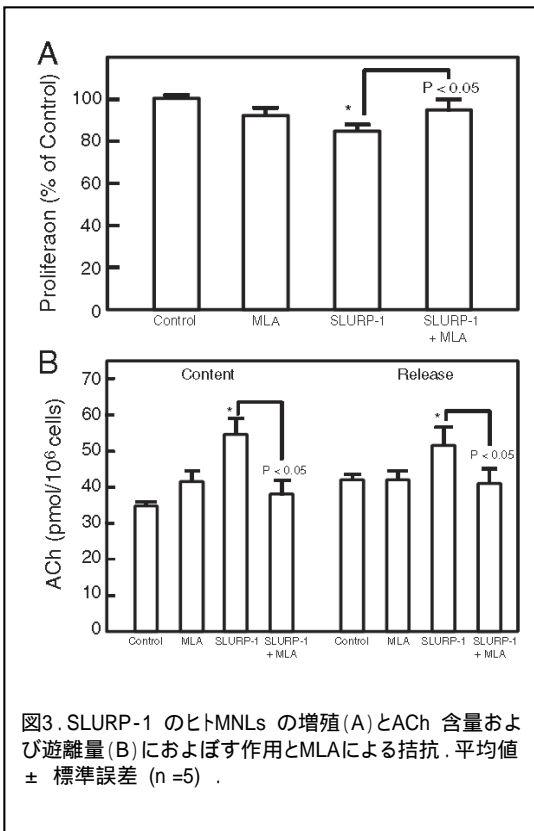
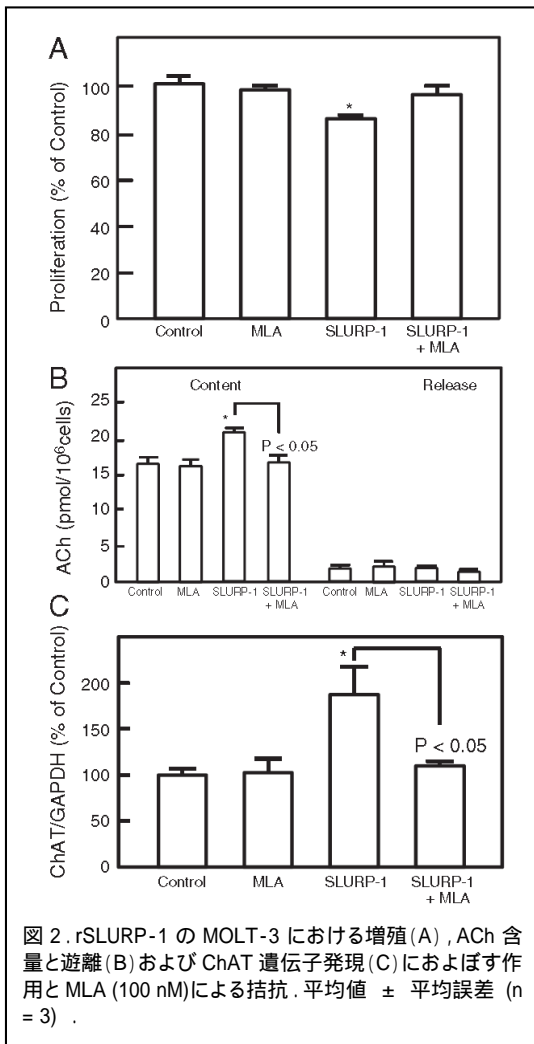
2) SLURP-1 の T 細胞機能に及ぼす作用の検討。

(1) rSLURP-1 のヒト T 細胞系白血病細胞株 MOLT-3 における増殖とコリン作動系活性に及ぼす作用。

rSLURP-1 (0.5  $\mu$ g/mL) は, 細胞増殖を対照群と比較して有意に抑制した (図 2A,  $P < 0.05$ )。しかし, ACh 含量を有意に増大させた (図 2B)。さらに rSLURP-1 は, ACh 合成酵素 ChAT 遺伝子発現を有意に増大させた (図 3C,  $P < 0.05$ )。  $\alpha 7$  nAChR 特異的拮抗薬 MLA (500 ng/mL) は, これらの rSLURP-1 による作用をすべて消失させた。

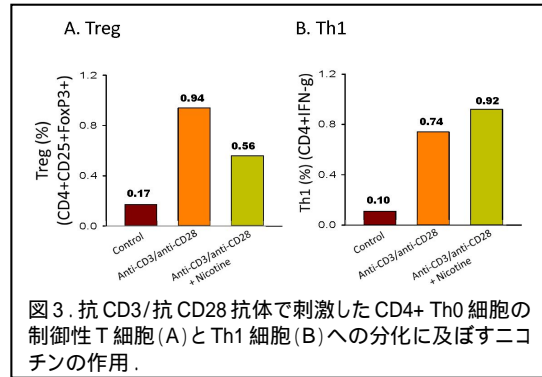
(2) rSLURP-1 のヒト MNLs における増殖とコリン作動系活性に及ぼす作用。

ヒト MNLs においても, rSLURP-1 は, 細胞増殖を有意に抑制し (図 3A,  $P < 0.05$ ), ACh 含量と分泌量を有意に増大させた (図 3B, いずれも  $P < 0.05$ )。 MLA は, これらの rSLURP-1 による作用をすべて消失させた。



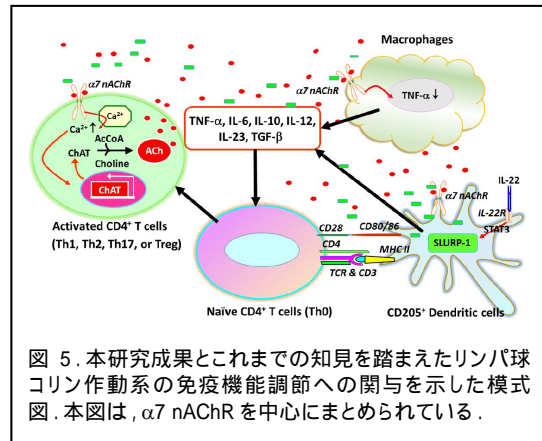
以上の知見から, SLURP-1 は,  $\alpha 7$  nAChR 刺激して T 細胞における機能的分化を促進させて, ChAT 遺伝子発現の促進を介して ACh 産生を増強して, リンパ球におけるコリン作動系活性の上昇させることが明らかになった.

3) ニコチンの T 細胞分化に及ぼす作用. Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fox3<sup>+</sup>) および Th1 (INF- $\gamma$ ) 発現誘導に及ぼすニコチンの作用 (図 4) を検討した.



無刺激の状態では, MNLs では 0.17% の CD4<sup>+</sup> T 細胞が Treg に分化した. anti-CD3/anti-CD28 抗体による活性化は, Treg への分化を 0.94% にまで上昇させた. ニコチン (500  $\mu$ M) は, Treg への分化を 0.56% にまで低下させた. すなわち, nAChR 刺激は Treg への分化を抑制した.

無刺激の MNLs では, CD4<sup>+</sup> T 細胞の 0.1% が Th1 に分化した. anti-CD3/anti-CD28 抗体刺激は, Th1 への分化を 0.74% にまで上昇させた. ニコチンは, Th1 への分化をさらに 0.92% にまで上昇させた. すなわち, nAChR 刺激は Th1 への分化を促進させることが判明した.



以上より, 本研究により, 1) 免疫器官の一部を構成する扁桃の CD205+DC に内因性  $\alpha 7$  nAChR アロステリック・リガンド SLURP-1 が発現しており, その周辺に CD4<sup>+</sup>T 細胞が存在することが判明した. 2) SLURP-1 は, ヒト T 細胞の  $\alpha 7$  nAChR を刺激して ACh 産生を増強するなどの T 細胞の機能的分化を促進することが発見された. 3) Th0 の nAChR 刺激は, Treg への分化を抑制し, Th1 への分化を促進する

ことが判明した。現在、nAChR 刺激の Th2 および Th17 への分化に及ぼす影響と $\alpha 7$  nAChR の役割を検討中である。

これらの知見をまとめて、図 5 に $\alpha 7$  nAChR の役割に焦点をおいたリンパ球コリン作動系の免疫機能調節における役割の一部を示した。Th0 と CD205+DCs との間における抗原提示反により、T 細胞は活性化されて ACh 産生を増大させる。T 細胞から遊離された ACh は、CD205+DCs から遊離された SLURP-1 と共に、自己およびマクロファージを含む周辺の免疫細胞上の $\alpha 7$  nAChR を刺激して、種々のサイトカイン産生を変化させる。これらのサイトカインの変化が、T 細胞分化に影響を及ぼす可能性が明らかになった。脾臓に存在する ACh は、SLURP-1 と共に、免疫機能の調節にも関与していることが証明された。

#### 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)

Fujii T, Takada-Takatori Y, Horiguchi K, Kawashima K: Mediator regulates acetylcholine release from T cells. *J Neuroimmunol* 244: 16-22, 2012, 査読有。

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K: Reconciling neuronally and non-neuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Ann New York Acad Sci* 1261: 7-17, 2012, 査読有。

Matsumoto H, Shibasaki K, Uchigashima M, Koizumi A, Kurachi M, Moriwaki Y, Misawa H, Kawashima K, Watanabe M, Kishi S, Ishizaki Y: Localization of SLURP-1 with Acetylcholine Related Molecules in the Retina: Implication of the Communication from Photoreceptor to RPE. *PLoS ONE* 7: e42841, 2012, 査読有。

Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Meurs H, Wessler I: The non-neuronal cholinergic system: Basic science, therapeutic implications and new perspectives. *Life Sci* 91: 969-972, 2012, 査読無。

Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K: Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells. *Life Sci* 91: 981-985, 2012, 査読有。

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H: Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci* 91: 1027-1032, 2012, 査読有。

Uchida S, Hotta H, Misawa H, Kawashima K:

The missing link between long-term stimulation of nicotinic receptors and the increases of acetylcholine release and vasodilation in the cerebral cortex of aged rats. *J Physiol Sci* 63: 95-111, 2013, 査読有。

Narumoto O, Niikura Y, Ishii S, Morihara H, Okashiro S, Nakahari T, Nakano T, Hitoshi Matsumura H, Shimamoto C, Moriwaki Y, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N: Effect of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1) on airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 438: 175-179, 2013, 査読有。

Fujii T, Horiguchi K, Sunaga H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Tsuji S, Kawashima K: SLURP-1, an endogenous  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, is expressed in CD205+ dendritic cells in human tonsils and potentiates lymphocytic cholinergic activity. *J Neuroimmunol* 267: 43-49, 2014, 査読有。

Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K: Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on  $\alpha 7$  nAChRs. *Inter Immunopharmacol* doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.015 (in press), 査読有。

[学会発表](計12件)

Kawashima K, Fujii T, Monnma F, Suzuki T: Roles of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in regulation of lymphocytic cholinergic activity. *Neuroscience* 2012. New Orleans, LO, USA (October 16, 2012).

Kawashima K, Fujii T, Horiguchi K, Moriwaki Y, Misawa H: SLURP-1, an endogenous  $\alpha 7$  nAChR allosteric ligand, expression in human immune organs and function in regulation of lymphocytic cholinergic activity. 2nd Joint meeting of the International Society for Autonomic Neuroscience and the European Federation of Autonomic Societies. Giessen, Germany (July 29-August 2, 2013).

Kawashima K: Expression and function of non-neuronal acetylcholine in immune system. 4<sup>th</sup> International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine. Giessen, Germany (August 28-30, 2014).

Fujii T, Kawashima K: Roles of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in development and function of T cells. The 88<sup>th</sup> Annual Meeting

of the Japan Pharmacological Society. Nagoya, Aichi-ken (March 17-20, 2015).

野戸 久美子, 隅谷 美佳, 淘江 由佳子, 間下 雅士, 川島 紘一郎, 藤井健志: T 細胞系 CCRF-CEM における  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬 A-582941 の細胞内機能に及ぼす影響. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 京都市山科区, 京都府 (2014 年 10 月 11 日).

隅谷 美佳, 野戸 久美子, 淘江 由佳子, 間下 雅士, 間賀田 泰寛, 川島 紘一郎, 藤井 健志: T 細胞系 CCRF-CEM における  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬 4BP-TQS の細胞内機能に及ぼす影響. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 京都市山科区, 京都府 (2014 年 10 月 11 日).

淘江 由佳子, 野戸 久美子, 隅谷 美佳, 間下 雅士, 川島 紘一郎, 藤井 健志: ヒト T 細胞系細胞株 CCRF-CEM における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に関するムスカリン受容体サブタイプの解析. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 京都市山科区, 京都府 (2014 年 10 月 11 日).

淘江 由佳子, 野戸 久美子, 隅谷 美佳, 間下 雅士, 川島 紘一郎, 藤井 健志: ヒト T 細胞系細胞株 CCRF-CEM における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に関するムスカリン受容体サブタイプの解析. 日本薬学会第 135 年会. 神戸市, 兵庫県 (2015 年 3 月 25-28 日).

野戸 久美子, 隅谷 美佳, 淘江 由佳子, 間下 雅士, 川島 紘一郎, 藤井 健志:  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬 A-582941 を用いた T 細胞系 CCRF-CEM の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇機構と生理的役割の探索. 日本薬学会第 135 年会. 神戸市, 兵庫県 (2015 年 3 月 25-28 日).

隅谷 美佳, 野戸 久美子, 淘江 由佳子, 間下 雅士, 間賀田 泰寛, 川島 紘一郎, 藤井 健志: T 細胞系 CCRF-CEM における  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬 4BP-TQS の細胞内機能に及ぼす影響. 日本薬学会第 135 年会. 神戸市, 兵庫県 (2015 年 3 月 25-28 日).

金取 里美, 間下 雅士, フォン フー ワー, 川島 紘一郎, 藤井 健志: IJ-337 の T 細胞に対する増殖抑制作用. 日本薬学会第 135 年会. 神戸市, 兵庫県 (2015 年 3 月 25-28 日).

高橋 麻衣子, 田中 菜穂子, 梅田 瞳, 間下 雅士, 川島 紘一郎, 藤井 健志:  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬が T 細胞分化へ及ぼす影響. 日本薬学会第 135

年会. 神戸市, 兵庫県 (2015 年 3 月 25-28 日).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川島紘一郎 (KAWASHIMA Koichiro)  
北里大学・薬学部・客員教授  
研究者番号: 70095008

### (2) 研究分担者

藤井健志 (FUJII Takeshi)  
同志社女子大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80255380

堀口和秀 (HORIGUCHI Kazuhide)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20377451

### (3) 連携研究者

三澤日出巳 (MISAWA Hidemi)  
慶応大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80219617

森脇康博 (MORIWAKI Yasuhiro)  
慶応大学・薬学部・講師  
研究者番号: 00392150