

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591587

研究課題名(和文) 胎仔の発達に伴う動脈管と肺動脈に発現する遺伝子の網羅的包括的研究

研究課題名(英文) mRNA-seq whole-transcriptome analysis of ductus arteriosus in fetal development

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

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)：動脈管の酸素感受性機構の研究における基礎的資料とするため、ラット未熟・成熟胎仔、新生仔動脈管及び高酸素・低酸素曝露成熟胎仔動脈管を試料として、mRNAの発現をRNAseq法によりトランスクリプトーム解析し、成熟期動脈管に高発現するGremlin 2や高酸素処理で発現上昇する16遺伝子を発見した。ラット成熟胎仔動脈管・肺動脈に発現するmiRNAをPCR array法により比較し、平滑筋細胞の増殖や内皮細胞の遊走に関連するmiRNAを見いだした。家兎動脈管タンパク質を二次元電気泳動法と質量分析法を併用し、成熟胎仔動脈管中膜に特異的に発現するトロポミオシンアイソフォームを同定した。

研究成果の概要(英文)：In order to collect fundamental data for research on oxygen sensitive ductus arteriosus (DA), we used total RNA (i.e., transcriptome) sequencing to determine mRNA expression profiles from DA samples of immature and mature fetal, newborn rats, and mature fetal rats incubated in buffer with high or low oxygen concentrations. We found that Gremlin 2 is highly expressed in mature fetal DA samples and 16 genes exhibited increased expression after high-oxygen treatment. We used a PCR array to compare miRNA expression between mature fetal DA and pulmonary artery samples. We found miRNAs that contribute to the enhancement of smooth muscle cell proliferation and the regulation of endothelial cell migration. Fetal and newborn DA proteins were analyzed using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. We determined a specific beta-tropomyosin isoform expressed on the medial layer of the DA that was not expressed on adjacent arteries during the maturation of the fetus.

研究分野：分子生物学

キーワード：動脈管 トランスクリプトーム マイクロRNA

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。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、1) 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濃度を増加させる、2) 細胞内小胞体からのCaイオンの放出を増加させる、3) Rho kinase 活性化を介し筋原線維のCa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。

筆者らは、酸素感受性Kチャネルの発現を中心に検討重ね、動脈管・肺動脈に多く発現するのはKv1.5であり、そのアクセサリチャネルのKvb1.2が動脈管では多く発現し機能を制御することを報告した。

近年塩基配列を解読する技術は革命的に進化をとげた。次世代シーケンサーを用いれば、微量RNAから全発現遺伝子情報(トランスクリプトーム, RNA-seq)を得られる。既知の遺伝子に限定されるこれまでの研究手法を超え、ターゲットとされていなかった遺伝子の存在やスプライシングの違いに加えて、発現量の情報も含む網羅的な発現遺伝子情報を次世代シーケンスに期待できる。miRNAは、mRNAの3'側の非翻訳領域に結合し、翻訳阻害やそのmRNAの分解に寄与する。miRNAは組織特異的または時期特異的に多数のmRNAを制御することで、細胞増殖・アポトーシス・発生と分化・代謝などに深く関与する。miRNAが結合する標的タンパク質を網羅したデータベース(TargetScan, Miranda, Pictar etc)などを活用し、miRNAによる制御という新しい視点から研究するための基礎情報の入手が期待できる。RNAの抽出後の試料からタンパク質も得られことから、発現タンパク質の情報も同時に得られる。mRNA、miRNA、タンパク質情報を得ることにより、試料間の変動の全体像を得ることを期待する。

2. 研究の目的

動脈管の酸素感受性機構を研究する上の基礎的資料を得るために、動脈管および肺動脈を対象とし、メッセンジャーRNA(mRNA)の発現をRNAseq法によるトランスクリプトーム解析、マイクロRNA(miRNA)の発現をPCR array法による解析、タンパク質を二次元電気泳動分離後質量分析法により同定・比較を実施する。この目的のための血管試料としては、発達段階の異なる動脈管試料

として、酸素感受性が未発達な未熟(ラット胎生19日又は家兎胎生21日)・成熟(ラット胎生21日又は家兎胎生30日)・新生仔(生後1日又は2日)の動脈管・肺動脈を分析対象とする。動脈管に酸素刺激を与えた試料として成熟ラット動脈管を高酸素・低酸素に曝露してトランスクリプトーム解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) トランスクリプトーム解析と定量PCR

① ラット血管試料採取と高酸素低酸素曝露

胎生21日(満期)、19日(未熟)胎仔及び生後1日の新生仔ラットから動脈管、主肺動脈、下行大動脈を冷却しつつ採取し、RNA later液に浸し-20°Cに保存した。血液などを顕微鏡下除去しプール分析試料とした。また、胎生21日胎仔の動脈管と主肺動脈を氷冷下採取し、1腹分の全胎仔血管試料を2群に分け、窒素(95% N₂-5% CO₂)又は酸素(95% O₂-5% CO₂)飽和 Krebs-Henseleit 緩衝液中 37°C 1時間培養し、それぞれ高酸素、低酸素曝露試料とした。

② Total RNA の調製と RNA-seq

RNAeasy kit (Qiagen)を用いて抽出し、DNaseI 処理を行った。1試料あたり 5µg の RNA を RNA-seq 用試料とし、次世代シーケンサーによる RNA 配列の解読を(株) 理研 ジェネシスに委託した。

③ トランスクリプトームデータの解析

発現量の指標である FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped, ある転写物上に mapping された fragments 数をその転写物の長さの合計と全ゲノムに mapping された全 fragments 数で正規化したもの)を用いて、異なる発達段階の動脈管や高酸素・低酸素処理動脈管グループ間の発現の違いを検定した(表2)。

④ 定量 PCR

②項で得た RNA の一部をランダムプライマーにより逆転写反応し cDNA を調製した。この cDNA をテンプレートとして、SYBR タイプの定量 PCR 酵素 (Takara) を用いてトランスクリプトームや miRNA 解析などにより選別された mRNA や miRNA の発現を定量し、解析結果の確認を実施した。

(2) miRNA 解析

① ラット血管試料採取

胎生21日(満期)胎仔ラットから動脈管及び主肺動脈を(1)項①と同様に採取し、分析試料とした。

② 低分子量 RNA の調製と miRNA 発現解析

QIAzol を用いてホモジナイズし、RNeasyMinElute Cleanup kit (Qiagen)用いて 200nt 以下の RNA を回収した。RT² miRNA first strand kit を用いて逆転写反応を行い、RT² miRNA PCR Array Rat miFinder Rat Genome (MAR-100A-4,

SABiosciences) を用いてリアルタイム PCR を行った。

(3) 動脈管に高発現するタンパク質群の検討

① 試料の採取及び窒素および酸素処理

日本白色家兎胎生 21 日 (未熟)、27 日、30 日 (満期) 胎仔を、麻酔下の母獣から採取した。胎仔と新生仔 (生後 2 日目) は、麻酔投与により安楽死後氷冷した。動脈管、主肺動脈、下行大動脈を採取、実体顕微鏡下氷冷生理食塩液中で血液成分などをできる限り除去し、RNAlater (Ambion) 中で -20°C に保存し分析試料とした。一部の主肺動脈、動脈管、大動脈の一連の血管組織を、リン酸緩衝 4% パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で固定し免疫染色用試料とした。

② 抗体の調製

採取した血管試料から total RNA を抽出、逆転写反応により cDNA 試料を調製、 β トロポミオシン (β Tm) のタンパク質コード領域を塩基配列情報から作成したプライマーを用いて PCR 増幅し、クローニングしたところ、最終的に variant 1 (exon 6b/9a 型)、2 (exon 6a/9d 型)、4 (exon 6a/9a 型) の 3 つのスプライシングの異なる β Tm 遺伝子を得た。10 個のヒスチジンをタグとして N 末端に融合発現する大腸菌発現ベクター (pET19b) にコード領域の全体又は一部を挿入、発現用大腸菌株に導入し、10x ヒスチジン融合タンパク質を IPTG 誘導により発現した。大腸菌を可溶化し、主に不溶体として発現したタンパク質を界面活性化剤により可溶化透析後、Ni 結合セファロースを用いてアフィニティ精製した。得られた発現タンパク質を濃縮、アジュバントと混合してマウスに複数回免疫し、定期的に採血し抗血清を調製した。得られた抗血清は、ELISA 法により抗原ペプチドとの反応性を検討、高抗体価を示した抗血清を以下の実験に用いた。

③ 部分欠失変異タンパク質の発現

家兎 β Tm variant 2 (exon 6a/9d 型) について、部分欠失変異 β Tm を PCR により調製した。増幅した部分欠失変異 β Tm cDNA を大腸菌発現ベクター (pET19b) に挿入、発現用大腸菌株に導入した。10x ヒスチジン融合部分欠失変異 β Tm を IPTG 誘導により発現し、大腸菌を可溶化したものを電気泳動用試料とした。

④ ウェスタンブロッティング

RNAlater 中に保存した組織試料から、Total RNA 抽出後、冷アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。7M 尿素、4% CHAPS を含む HEPES 緩衝液、pH8.6 によりタンパク質を可溶化した。各組織試料から抽出されたタンパク質は、タンパク質濃度を測定 (Bradford ultra, Novexin) 後、4-12% グラ

ジエント SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 又は 15% SDS-PAGE により分離し、ウェスタンブロッティング法により PVDF 膜に転写、3% スキムミルクでブロッキング後、各抗体 (抗血清) とインキュベート、HRP 標識二次抗体を用いた化学発光法により検出した。

⑤ 免疫染色

PFA 固定試料をパラフィン包埋し、薄切切片 (4 μ m) を作製した。脱パラフィン後、98°C 45 分間賦活化 (イムノセイバー) し、内在性のペルオキシダーゼ活性を阻害するために 0.3% 過酸化水素液処理を 30 分間行った。5% BSA/TBST を用いてブロッキング後、 β Tm ポリクローナル抗体 (マウス抗血清、 β Tm pAb)、 β Tm モノクローナル抗体 (M07, clone 3C8, Abnova, β Tm mAb)、並びに抗平滑筋アクチンモノクローナル抗体 (ab18460-1, Abnova, SMA mAb) を一次抗体として、VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG Kit を用いてペルオキシダーゼ (DAB) 染色を行い、ヘマトキシリンカウンター染色後、脱水・透徹、封入した。

4. 研究成果

(1) 動脈管の次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析

① 検体の品質評価

Agilent 2100 Bioanalyzer により品質評価したところ、品質基準を満たしていたので、イルミナ社 HiSeq2000 を用いて DNA シーケンス解析を行った。

② 検体の前処理

イルミナ社のプロトコールに従いライブラリ (長さ: アダプタを含む 273-282bp) を作製した。シーケンス解析は、イルミナ社のフローセルを使用、有効 read length 100 bp、paired-end、multiplex 法で行った。リードデータの品質チェックと参照配列へのマッピング・アセンブリの結果を表 1 に示した。比較したグループ名、発現レベルを比較した isoform 数、遺伝子数、CDS 数を表 2 にまとめた。

試料名	Reads (original)	Reads (modified)	Ratio (%) (Mod/Ori)	Mapped reads	Rate (%)	アセンブリされた転写物数	コンセンサスな転写物数
DA-21	47,378,026	46,790,662	98.76	44,743,364	95.62	386,668	562,758
DA-19	45,335,796	44,829,264	98.88	42,879,576	95.55	390,686	
DA-NB	44,933,036	44,412,996	98.84	42,482,211	95.65	387,162	
DA-O2	43,836,636	43,094,026	98.31	41,103,019	95.37	387,748	
DA-N2	42,567,160	41,765,138	98.12	39,786,756	95.26	383,419	
PA-21	47,235,002	46,418,354	98.27	44,261,340	95.35	389,708	

表1 リードデータの品質チェックと参照配列へのマッピング・アセンブリ

比較グループ	isoform	gene	CDS
DA-21 vs DA-19	27,923	14,476	10,233
DA-21 vs DA-NB	27,228	14,150	10,094
DA-21 vs DA-O2	27,131	14,022	10,006
DA-21 vs DA-N2	26,842	13,850	9,931
DA-21 vs PA-21	28,014	14,581	10,314
DA-O2 vs DA-N2	25,989	13,416	9,696

表2 発現レベルを比較した isoform、遺伝子、CDS 数

③ 遺伝子発現量の比較

③-1 発達に伴う動脈管発現遺伝子の変化

発現レベルの指標である FPKM 値を用いて、

Gene name	FPKM			
	DA-19	DA-21	DA-NB	PA-21
Snrpn	66.4	267.9	230.7	75.2
Tnfrsf11b	34.3	213.4	130.4	56.8
Rnd3	30.0	114.1	105.1	88.8
Grem2	9.7	58.0	18.4	10.2
Nuf2	11.4	43.9	48.9	25.0
Adamts8	9.1	36.0	23.4	14.3
Lypd6	3.5	16.1	16.5	2.9
Map2	2.3	10.3	11.0	8.6
Ceacam11	0.0	2.4	0.1	0.1

表3 満期胎仔動脈管で高発現する遺伝子

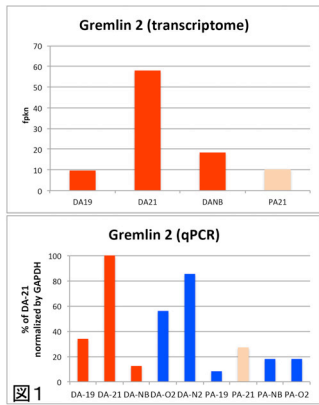


図1

(qPCR) を用いて、これら 9 遺伝子 mRNA の発現を定量し、FPKM 値と比較すると表 3 中に赤太字で示した遺伝子でよく一致していた。図 1 に Grem2 の結果を示した。

③-2 高酸素・低酸素処理に伴う動脈管発現遺伝子の変化

Gene name	FPKM		
	DA-21	DA-O2	DA-N2
Ccl2	1.07	336.10	145.28
Chac1	0.80	51.69	20.63
Cyp11b1	4.30	42.50	19.72
Mat2a	28.40	31.59	14.04
Sesn2	4.80	30.01	12.14
Nr4a3	0.74	24.36	10.58
Il6	0.04	22.52	9.72
Irgm2	3.30	25.21	8.67
Egr3	0.09	14.87	6.87
Sphk1	0.45	16.89	4.64
Trib3	3.80	13.39	4.60
Arc	0.75	10.15	4.35
Osmr	1.73	10.35	4.13
TAFII-105	0.97	9.60	2.76
Irf8	1.12	7.49	2.57
Srxn1	0.23	3.06	0.48

表4 高酸素処理満期動脈管で高発現する遺伝子

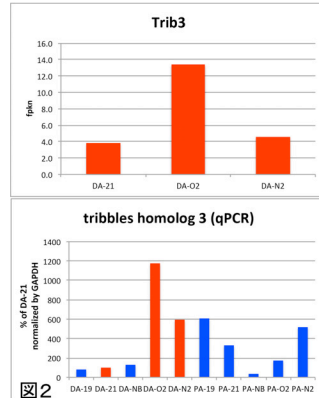


図2

DA-O2 (高酸素処理した胎生 21 日胎仔動脈管) と DA-N2 (低酸素処理した胎生 21 日胎仔動脈管) を比較したところ、有意差を認めた遺伝子は 22 あった。その内、高酸素処理で発現が多いものが 16 あり (表 4)、qPCR を用いてその mRNA 量を定量し、FPKM 値と比較すると、表 4 中に赤太字で示した遺伝子でよく一致していた。図 2 に Tribles

homolog 3 の定量の結果を示した。

(2) 動脈管と肺動脈に発現する miRNA 解析 miRNA PCR Array を用いて、352 miRNA の発現量を測定し、満期胎仔動脈管と肺動脈を比較した (図 3)。定量 PCR による信頼性のチェック後、発現量の指標である fold regulation 値が 10 倍以上の違う miRNA が DA>PA で 24、PA>DA で 2 見つかった (表 5)。DA>PA の miRNA で最も発現量が多かった miR-208 は、

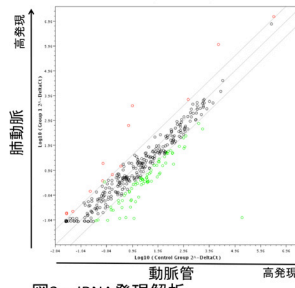


図3 miRNA発現解析

DA>PA			PA>DA
miR-208	miR-130b	miR-329	miR-203
miR-196a	miR-219-5p	miR-451	miR-205
miR-34c	miR-33	miR-137	—
miR-124	miR-222	miR-300-3p	—
miR-196b	miR-99a*	miR-300-5p	—
miR-376a	miR-338	miR-181c	—
miR-153	miR-144	miR-130a	—
miR-363	miR-449a	miR-204	—

表5 動脈管と肺動脈に特異的に発現するmiRNA

平滑筋細胞の増殖を促し、次に多い miR-196a は、内皮細胞の遊走を抑制するが、miR-196a 自身の発現は vascular endothelial growth factor A (VEGF) によって抑制される。PA>DA の 2 つの miRNA はいずれも VEGF の発現を抑え、増殖を抑制する作用をもつ。動脈管と肺動脈における興味深い違いが、miRNA 解析によって明らかになった。

(3) 動脈管に高発現するタンパク質群の検討 家兔胎生 30 日 (満期) 胎仔動脈管抽出タンパク質の二次元電気泳動法による分離と質量分析法による同定の結果、筋収縮制御タンパク質に特に発現量の多いものを見いだした (図 4)。これらの中から β トロポミオシン (β Tm) に焦点を当て、研究を進めた。

β Tm の発現量の変動を知るために 21 日 (未熟)、27、30 日 (成熟) 胎仔、生後 2 日新生仔の動脈管・肺動脈・大動脈抽出タンパク質 (15 μ g/レーン) のウェスタンブロットを、

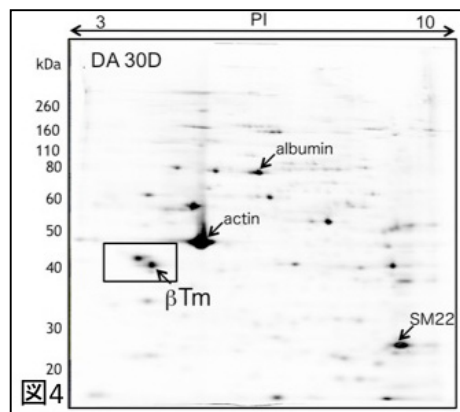
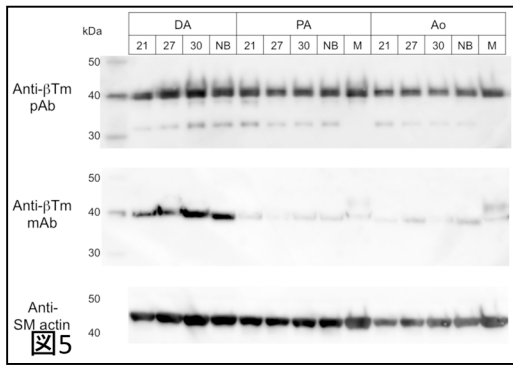
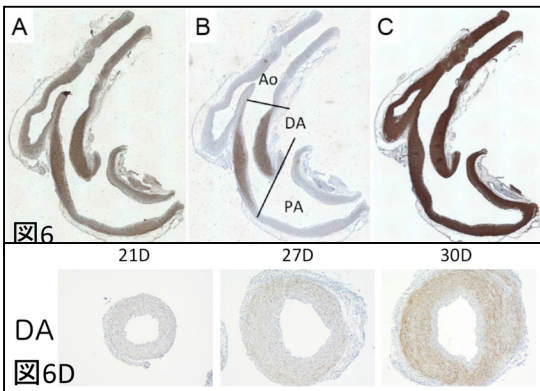


図4



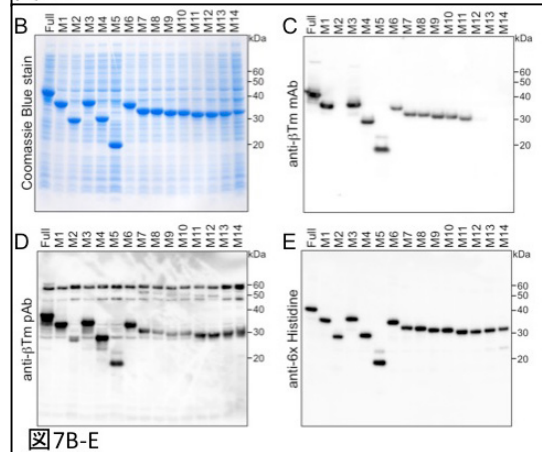
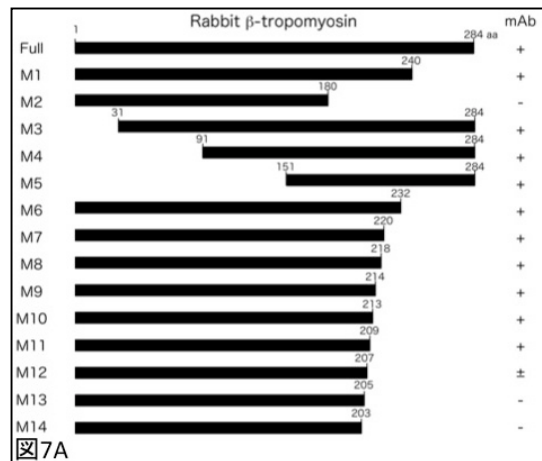
β Tm pAb、β Tm mAb、並びに SMA mAb により検出した (図 5)。β Tm pAb による検出結果から、β Tm の発現は、未熟から満期胎仔動脈管で徐々に増加、新生仔でやや低下することが示された。肺動脈及び大動脈における β Tm の発現は、動脈管に比べて全般に低かった。β Tm mAb を用いて検出したところ、動脈管では pAb と同様のおよそ 40kDa のバンドがみられたが、肺動脈や大動脈では、ほとんど検出されなかった。SMA mAb を用いると、動脈管では、未熟から満期胎仔で徐々に増加し、新生仔は 30 日胎仔並みの高い発現を示した。肺動脈及び大動脈における SMA の発現は成獣で最も高く、肺動脈では、胎仔期から新生仔までほぼ同等の発現を示し、大動脈では、未熟胎仔から成熟胎仔、新生仔、成獣と徐々に平滑筋アクチンの発現量が増加していた。

満期胎仔動脈管及びその周辺の大血管について、β Tm pAb、β Tm mAb、並びに SMA mAb を用いて免疫染色を実施した (図 6)。β Tm pAb を用いた染色から、β Tm が、周囲の肺動脈や大動脈に比べて動脈管に比較的高発現することが示された (図 6A)。β Tm mAb を用いると、動脈管中膜に極めて特異的な発現が示された。これらの β Tm 抗体の動脈管および周囲の血管の検出の違いは、pAb が全 β Tm を抗原として調製された抗血清であるためすべての β Tm アイソフォームを検出し、mAb は単一のエピトープを検出するため、限られた β Tm アイソフォームのみを検出したと考えられた。SMA は、動脈管、肺動脈、大動脈のいずれの中膜にも高発現していた。図 6D に家兔胎生 21, 27, 30 日胎仔の

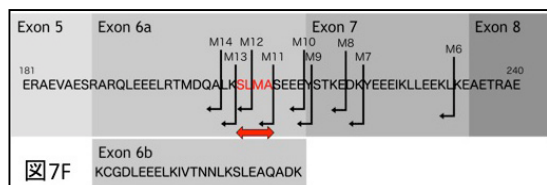


動脈管の輪切り切片を β Tm mAb で免疫染色した結果を示した。β Tm mAb で検出される β Tm のアイソフォームは、胎仔の成熟に従い、動脈管で発現量が増加した。肺動脈・大動脈では、いずれの時点の胎仔においても、ほとんど検出されなかった (図示さず)。これらの結果から、β Tm mAb で検出される β Tm は、満期動脈管のマーカースとなり得ると考えられた。

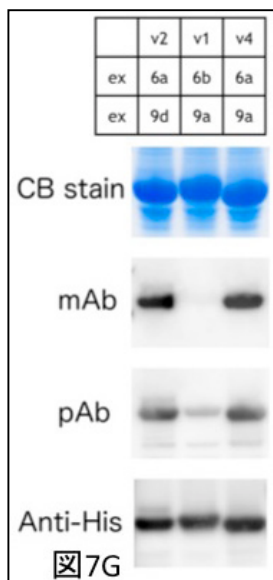
そこで、動脈管特異的な β Tm アイソフォームを探索するため、β Tm mAb のエピトープを決定することとした。β Tm (variant 2, exon 6a/9d 型) の一連の部分欠失変異タンパク質を N 末に 10 個ヒスチジンタグをつけて大腸菌に発現させ (図 7A)、SDS-PAGE を実施し、Coomassie blue 染色を行った (図 7B)。これらの β Tm の部分欠失変異タンパク質のウェスタンブロッティングを作製し、β Tm mAb で検出した (図 7C)。β Tm mAb は、欠失変異 M11 (アミノ酸 1-209) を良好に検出したが、欠失変異 M12 (アミノ酸 1-207) をごく弱く検出し、欠失変異 M13 (アミノ酸 1-205) をまったく検出しなかった。これらの結果から、β Tm mAb のエピトープは、β Tm のアミノ酸 206-209 (アミノ酸配列:SLMA)にあると推定された (図 7C, 7F)。図 7D は、β Tm の部分欠失変異タンパク質を β Tm pAb で検出したものである。β Tm pAb が、β Tm のすべての領域を検出できる



ことが示された。さらに、抗 6x ヒスチジン抗体を用いて、一連の大腸菌発現 β Tm の部分欠失変異タンパク質を検出した。すべての β Tm の部分欠失変異タンパク質は、ヒスチジンタグがついており、本抗体で良好に検出可能であり、図 7B に示した太い染色バンドが目的の部分欠失変異発現タンパク質であることを確認できた(図 7D)。これらの結果から、本 β Tm mAb は、エクソン 6a の一部であるアミノ酸 206-209 を検出していることが判明した(図 7F)。



家兔胎仔血管 mRNA から、クローニングにより β Tm3 種類のトランスクリプト (variant 2, exon 6a/9d 型, variant 1, exon 6b/9a 型, variant 4, exon 6a/9a 型) を得た。これら 3 つの β Tm アイソフォームの N 末に 10 個ヒスチジンタグをつけて大腸菌に発現させ、SDS-PAGE を実施し、Coomassie blue 染色 (CB stain) を行い、 β Tm mAb、 β Tm pAb 及び抗 6x ヒスチジン抗体で検出した(図 7G)。 β Tm pAb 及び抗 6x ヒスチジン抗体は、3 つの variant タンパク質を検出したが、mAb は、 β Tm の exon 6a を含む variant 2 及び 4 のみを検出した。



以上の結果から、成熟胎仔動脈管の中膜平滑筋細胞には、 β Tm の exon 6a を含むアイソフォームが発現していることが明らかとなった。抗 β TmmAb (M07, clone 3C8, Abnova) は、満期胎仔の動脈管の中膜を特異的に検出し、周囲の肺動脈や大動脈と区別を可能にした。 β Tm の高発現は、成熟胎仔動脈管の収縮弛緩制御機構の特徴の一つではないかと推定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘. 胎生期胎児血管の収縮制御に関する遺伝子の機能解析 (胎仔動脈管に高発現するタン

パク質群の検討) (財) 日本心臓血圧研究振興会 (平成二十五年度研究業績集)

29, 掲載決定 (2015)

- ② 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘. 胎生期胎児血管の収縮制御に関する遺伝子の機能解析 (胎仔動脈管に高発現するタンパク質群の検討 2) (財) 日本心臓血圧研究振興会 (平成二十五年度研究業績集) 28, 25-31 (2014)
- ③ 中西敏雄, 羽山恵美子, 勝部康弘. 胎生期胎児血管の収縮制御に関する遺伝子の機能解析 (胎仔動脈管に高発現するタンパク質群の検討) (財) 日本心臓血圧研究振興会 (平成二十四年度研究業績集) 27, 27-35 (2013)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 羽山恵美子, 中西敏雄. Phos-tag SDS-PAGE を用いた動脈管・肺動脈の筋収縮制御蛋白質のリン酸化の検討 大 50 回日本小児循環器学会, 2014.7.3-5, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
- ② 羽山恵美子, 中西敏雄. Developmental Difference in Maturation of Sarcoplasmic Reticulum and Contractile Proteins in the Large Blood Vessels Influences Their Contractility. The 7th TAKAO International Symposium, 2013.7.14 (国立オリンピック記念青少年総合センター, 東京, 渋谷区)
- ③ 羽山恵美子. PDA 閉鎖のメカニズム-酵素でなぜ閉じるか. 第 22 回心研小児科夏季セミナー, 東京女子医科大学, 2012.7.28 (東京女子医科大学 総合外来センター5 階大会議室, 東京, 新宿区)

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