

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659548

研究課題名(和文) 中枢5-HT細胞における転写因子Pet-1の標的遺伝子・共役転写因子の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive identification of the Pet-1-target genes by chromatin immunoprecipitation assays in RN46A cells derived from the rat raphe nucleus.

研究代表者

松井 宏晃 (Matsui, Hiroaki)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90181685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチン免疫沈降法(ChIP)により、ラット縫線核由来RN46A細胞における中枢セロトニン神経細胞特異的転写因子Pet-1の標的遺伝子同定を試みた。RN46A細胞では、神経特異的抑制因子(NRSF)結合配列(NRSE)を有する遺伝子へのPet-1結合阻害にNRSFが関与すること、NRSEを欠く遺伝子へのPet-1結合が検出できない場合もあり、NRSF以外の抑制性因子もPet-1結合阻害に関与すること、またPet-1過剰発現条件下でもChIP同定が困難な場合があることが解った。従って、Pet-1標的遺伝子のChIP同定には、これらの抑制性因子を排除した実験系構築が必要である。

研究成果の概要(英文)：To identify Pet-1 (serotonergic neuron-specific transcription factor)-binding sites in rat raphe nucleus-derived RN46A cells, chromatin-immunoprecipitation (ChIP) assays were performed. It was revealed that Pet-1 binding was inhibited through the neuron-restrictive silencer factor(NRSF)-NRSF binding element(NRSE) system or the potential repressor proteins independent of NRSF. Additionally, the detection of Pet-1 binding to target genes was occasionally difficult even under conditions where Pet-1 was overexpressed. Taken together, to exclude the function of repressor proteins including NRSF may be necessary to identify the Pet-1 binding to its target genes by ChIP assays in RN46A cells. To overcome these difficulties should be required to use RN46A cells as a proper model of central serotonergic neurons and characterize the Pet-1-mediated transcriptional network in serotonergic neurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：セロトニン神経系 クロマチン免疫沈降法 ラット縫線核由来RN46A細胞 セロトニン神経細胞特異的転写因子Pet-1 Pet-1標的遺伝子 神経特異的抑制因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 気分障害の病因として、脳発達期（特に胎児期）の微細な神経回路の形成障害が、将来の疾患発症の脆弱性基盤に関係するという「神経発達障害仮説」が注目されている。しかし、その神経生物学的実体は未だ解明されていない。

(2) セロトニン(5-HT)神経前駆細胞に転写因子 *Lmx1b*、*Gata2*、*Gata3* が順次作用した後、5-HT 神経細胞に限局して発現する最重要転写因子 *Pet-1* が作用し、5-HT 神経細胞の分化が完了する (J.Neurosci., 19: 10348-10356 (1999); J.Neurosci., 25: 2628-2636 (2005))。Pet-1 は ETS DNA 結合ドメイン転写因子ファミリーに属する。しかし、5-HT 神経細胞における標的遺伝子は未同定である。さらに、Pet-1 の単純な構造(238 アミノ酸残基)から、他の転写因子と協調して機能すると推測されるが、Pet-1 と共役(相互作用)する転写因子も同定されていない。

2. 研究の目的

(1) 平成 16～18 年度の研究(基盤研究 C; 16591170)で、ヒト脳型トリプトファン水酸化酵素(TPH2)遺伝子プロモーター領域の構造・機能解析を行い、複数の Pet-1 結合配列(GGAA element)を見出した。また、5-HT トランスポーター(5HTT)、5-HT_{1A} 受容体(5-HT_{1A}R)、vesicular monoamine transporter 2 (VMAT 2) 遺伝子などの、いわゆる 5-HT neuronal genes のプロモーター領域にも GGAA 配列が見出されている (J.Neurosci., 19: 10348-10356(1999))。しかし、これら 5-HT neuronal genes は Pet-1 標的遺伝子の一部である可能性が高い。従って、中枢 5-HT 神経細胞の発生・分化における Pet-1 機能の解明には、Pet-1 標的遺伝子(群)および共役転写因子(群)を、網羅的に同定する事が必須であるとの着想に到った。

(2) 本研究では、中枢 5-HT 作動性神経系の構築に関わる最重要転写因子 Pet-1 に注目し、縫線核由来培養細胞を用い、クロマチン免疫沈降法および免疫沈降-2 次元ゲル電気泳動-マススペクトロメトリー法を応用し、中枢 5-HT 神経細胞における Pet-1 標的遺伝子および共役転写因子を網羅的に同定し、「Pet-1 標的遺伝子の発現制御ネットワーク障害」の観点から気分障害の病因解明、生物学的マーカー探索、新規治療法創出へ繋がる基礎的知見を得ることを目的とする。

(3) 縫線核 5-HT 神経細胞に極めて限局して発現する Pet-1 の標的遺伝子および共役転写因子の同定は、中枢 5-HT 神経系の dysregulation が関与すると想定される気分障害のみならず、不安障害、強迫性障害、自閉

症など様々な精神障害の病因解明、生物学的マーカーおよび新規治療法の確立などに繋がる、重要な基礎的知見をもたらすものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) クロマチン免疫沈降法を用いた Pet-1 結合部位の同定。

中枢 5-HT 神経細胞のモデル細胞であるラット縫線核由来 RN46A 細胞を用い、クロマチン免疫沈降法により得た Pet-1 結合部位 DNA 断片を増幅後、サブクローニング-塩基配列決定法にて標的遺伝子の網羅的同定を試みる。また、Pet-1 タンパク質免疫沈降-2 次元ゲル電気泳動-質量分析法により Pet-1 共役転写因子の網羅的同定を試みる。

33 (分化前)にて培養した RN46A 細胞を、タンパク質-タンパク質間架橋反応試薬で前処理し、Pet-1-Pet-1 共役転写因子複合体を形成させる。引き続き、タンパク質-DNA 間架橋反応試薬処理を行ない、Pet-1 および Pet-1-Pet-1 共役転写因子複合体をクロマチンに結合させる。クロマチンを超音波処理にて短断片化した後、抗 Pet-1 抗体と 4 一晚反応させ、Pet-1-DNA 複合体を免疫沈降させた。Pet-1 標的遺伝子の DNA 断片をサブクローニング後シーケンス解析する。

③ 同様の実験を 39 (分化後)培養後の RN46A 細胞にて行う。

分化ステージの異なる RN46A 細胞を用いた解析から、分化状態依存性 Pet-1 標的遺伝子を同定する。

(2) プロテオーム解析による Pet-1 共役転写因子の同定。

33 および 39 にて培養した RN46A 細胞から得た核タンパク質を Pet-1 抗体で処理し、Pet-1-Pet-1 共役転写因子複合体を免疫沈降させ、得たタンパク質試料を 2 次元ゲル電気泳動-LC-MS/MS 法にて分析する。

得られた LC-MS/MS データに合致するタンパク質を、既に公表されている公的タンパク質データベースを用い検索し、Pet-1 共役転写因子を同定する。

(3) 以上の結果を踏まえ、5-HT 神経細胞の分化ステージ依存性 Pet-1 標的遺伝子ならびに Pet-1 共役転写因子ネットワークを明らかにする。

(4) ヒト *TPH2* プロモーター領域 Pet-1 結合部位の機能的同定。

ヒト *TPH2* プロモーター領域(翻訳開始 ATG コドンから 5' 上流 ~ 2-kb)を PCR にて増幅後、pGL4-Basic のルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入し、プロモーター活性測定用レポーターベクター-TPH2-55 を構築した。

ヒト Pet-1 を異所性に発現する、ヒト小細胞肺癌 SHP-77 細胞から RT-PCR にて、ヒト Pet-1 cDNA を増幅後、pCMV-Script ベクターへ挿入し、ヒト Pet-1 発現ベクター-pCMV-hPet-1 を構築した。pCMV-hPet-1 を基に、推定されるヒト Pet-1 機能ドメイン発現

ベクター、pCMV-hPet-1(N(アミノ末端側ドメイン)+DBD(ETS DNA 結合ドメイン))、pCMV-hPet-1(DBD+C(カルボキシル末端側ドメイン))およびpCMV-hPet-1(DBD)を構築した。

③VP64(転写活性化ドメイン VP16の4量体)発現ベクター(京都大学 今西未来博士から分与を受けた)を基に、VP64ドメインをPCR増幅後、pCMV-hPet-1 および pCMV-hPet-1(DBD)へ挿入し、人工転写因子 pCMV-VP64-hPet-1 および pCMV-VP64-hPet-1(DBD)を構築した。これらの人工転写因子VP64-hPet-1 および VP64-hPet-1(DBD)は、Pet-1のDNA結合部位を有しており、内在性のPet-1と同様にDNAへ結合し、VP64の転写活性化作用により、標的遺伝子転写を促進する生物活性を有する。

(5)恒常的に神経特異的抑制因子(Nrsf)発現を低下させたRN46A細胞の構築。

ラットNrsf shRNA plasmidをRN46A細胞へ導入し、puromycin処理選択とTPH2-55活性測定により、内在性Nrsf発現レベルを低下させたRN46A細胞を選別した。

(6)種々の方法によるRN46A細胞Nrsfレベル修飾法の検討。

ラットNrsfプロモーター領域の塩基配列がデータベースには登録されていないため、ラットゲノミックDNAから、PCR法にて、Nrsfプロモーター領域をクローニングした。得た塩基配列を基に、ラットNrsf転写に関わる転写因子機能を抑制することにより、Nrsfレベルを低下させる方法を検討した。NRSFレベルがユビキチン-プロテアソーム系による分解経路の調節を受けることから、同システムの修飾により、RN46A細胞Nrsfレベルを低下させる方法を検討した。すなわち、ユビキチン-プロテアソーム分解系の構成タンパク質の過剰発現、分解系でNrsfが認識されるために必要なNrsfリン酸化酵素の過剰発現、さらにNrsf脱ユビキチン化酵素活性阻害薬によるNrsf分解系促進など、種々の方略を検討した。

(7)マウス中枢神経由来A1-mes細胞を用いたヒトTPH2プロモーター活性調節機構研究。RN46A細胞における解析が難航し、代替モデル細胞を用いることの必要性が生じ、文献検索から、A1-mes細胞を見出した。そこで、A1-mes細胞の樹立者である、Luca Colucci-D'Amato博士(イタリア、ナポリ大学)から分与を受け、本研究におけるA1-mes細胞の有用性評価目的で実験を行った。

4. 研究成果

(1)RN46A細胞はラット縫線核由来である。ラット脳におけるPet-1結合部位を同定した報告は未だない。マウス脳の実験などからPet-1、Tph2、Vmat2、Sert、Aadc、Maob、Htr1a、Htr1b、Gtpch1、Qdpr、Gfrpプロモーター領域にPet-1結合部位が存在すると推定された。

Denerisらは、クロマチン免疫沈降解析により、マウスTph2 -863/-712領域に、2か所(-863、CTTTCC; -718、ATTTCC)のPet-1結合部位を同定した(Nat Neurosci. (2010)13:1190-1198)。Denerisらは、クロマチン免疫沈降解析の詳細(定量PCRのデータ、電気泳動データなど)やゲルシフトアッセイなど、クロマチン免疫沈降結果を補完するデータを公開していないが、いずれにしても、興味あることは、マウス脳でクロマチン免疫沈降同定されたPet-1結合部位は、Pet-1結合コンセンサス配列GGAART(R;AあるいはT)とは、必ずしも一致しないことである。このことから、Pet-1結合配列には冗長性があるものと考えられ、塩基配列のみの検索では、内在性Pet-1結合部位を見いだせない場合もあることを示唆している。

Pet-1標的遺伝子のうち、中枢5-HT神経細胞特異的な転写活性を有するTph2プロモーター領域を選択し、機能的Pet-1結合活性をTPH2-55レポーターベクターを用い調べた。ヒトTPH2プロモーター領域では、マウスとの相同領域にPet-1結合配列は検出されず、さらに5'上流に3か所のPet-1結合配列(-1648/-1643、ATTTCC;-1019/-1014、ATTTCC;-1010/-1005、ATTTCC)を見出した。これら3か所は、Pet-1結合コンセンサス配列に完全に一致しており、特に-1019/-1014、-1010/-1005領域は、ATTTCCATGATTTCCと、2か所のPet-1結合配列が、タンデムに連なった特異な構造である。

TPH2-55とpCMV-hPet-1をRN46A細胞へ共導入し、ヒトTPH2プロモーター活性の変化を調べた。しかし、Pet-1過剰発現条件下で、ヒトTPH2プロモーター活性の変化を認めなかった。

(2)Pet-1は、ETS DNA結合ドメインを挟んで、機能未同定のアミノ末端およびカルボキシル末端ドメインから構成される、比較的単純な構造を有する。Pet-1結合部位を介する、ヒトTPH2プロモーター活性変化検出を容易にする目的で、VP64-hPet-1融合人工転写因子を過剰発現し、Pet-1の作用を調べた。Pet-1のアミノ基あるいはカルボキシル基末端ドメインの機能が未同定であるため、これらが、抑制的に作用し、VP64の転写活性化能を打ち消してしまう可能性を除くため、Pet-1のETS DNAドメインのみにVP64を連結した、VP64-hPet-1(DBD)融合人工転写因子の過剰発現作用も合わせて調べた。しかし、予想に反して、pCMV-hPet-1あるいはpCMV-hPet-1(DBD)過剰発現は、いずれの場合も、TPH2-55のプロモーター活性に有意な増加をもたらさなかった。Pet-1およびVP64-Pet1融合人工転写因子の過剰発現後、TPH2-55プロモーター活性増加が観察されなかったことから、この時点では、Pet-1が、TPH2プロモーター領域のPet-1結合コンセンサス配列に結合し、転写を促進するという、当初のスキームは確認できなかった。

ヒト *TPH2* プロモーター領域には、非典型的 NRSF 結合部位 (neuron-restrictive silencer element, NRSE) が存在する。VP64-hNRSF (DBD)人工転写因子発現ベクターを構築し、TPH2-55 と共に RN46A 細胞へ導入すると、TPH2-55 プロモーター活性は、有意に増加した。従って、VP64 融合人工転写因子は、RN46A 細胞において、予想した通り、本来の転写因子結合部位へ結合し、近傍の標的遺伝子発現を促進することが確認できた。これらの結果は、VP64-Pet-1 融合人工転写因子の効果が認められなかったのは、そもそも VP64 融合人工転写因子が RN46A 細胞内で機能しないのではなく、Pet-1 と Pet-1 結合部位との相互作用の障害に起因する可能性を示唆する。加えて、Pet-1 過剰発現条件下でも、Pet-1 の効果が認め難いことから、Pet-1 結合を検出することは、当初の予想に反して、容易ではないことが伺えた。

(3)ラット *Tph2* プロモーター領域では、マウスと相同性の高い領域に Pet-1 結合配列を見出した。すなわち、マウス脳でクロマチン免疫沈降解析から同定された 2 か所の Pet-1 結合配列(-835, CTTTCC; -688, ATTTCC)を検出した。-835 に位置する Pet-1 結合配列は、マウスと同様、コンセンサス配列とは一致しなかった。そこで、-835 および-688 を含む領域を標的にクロマチン免疫沈降解析を行った。RN46A 細胞をホルムアルデヒドで処理し、得られたクロマチンを超音波処理後、抗 Pet-1 抗体 (Pet-1 のアミノ末端側認識抗体) で免疫沈降させ、関心領域を PCR にて増幅した。しかし、上記領域に Pet-1 が結合する確証は得られなかった。従って、この時点で、マウス *Tph2* で報告された Pet-1 結合部位と高い相同性を有するラット *Tph2* プロモーター領域に Pet-1 が実際に結合することを示す証拠が得られなかった。

(4)RN46A 細胞は *Nrsf* を高発現する。RT-PCR 解析すると、分裂増殖状態 (33 培養) のみならず、分裂停止・分化後状態 (39 培養) においても、*Nrsf* mRNA の発現を確認した。一般に神経細胞では分化状態に至る前に NRSF の発現レベルが低下することが知られている。そこで、*Nrsf* が持続的高発現レベルであることと、Pet-1 結合活性が検出できなかったこととの間に、何らかの関連性があるのではと考え、RN46A 細胞の *Nrsf* 発現レベルを低下させた条件下で、Pet-1 結合活性を調べた。

ラット *Nrsf* shRNA を一過性に RN46A 細胞に発現させると、TPH2-55 プロモーター活性は増加した。この結果は、*Nrsf* shRNA 導入後、内在性 *Nrsf* mRNA が減少し、その結果 *Nrsf* レベルが低下し、*Nrsf*-NRSE システムを介する転写抑制作用が解除されたことを示している。そこで、恒常的に *Nrsf* shRNA を発現する RN46A 細胞樹立を試みた。*Nrsf* は神経細胞の分裂増殖状態維持機能にも関わると報告されている。実際、恒常的 *Nrsf* shRNA

発現 RN46A 細胞を選別する過程で、おそらく、*Nrsf* shRNA を高発現した (*Nrsf* 発現レベルが強く抑制された) RN46A 細胞は、分裂増殖能も低下し、選別の過程で排除されやすくなり、結果として、*Nrsf* shRNA 高発現 RN46A 細胞は選択できなかった可能性が考えられた。TPH2-55 プロモーター活性を指標に恒常的 *Nrsf* shRNA 発現の効果調べると、TPH2-55 プロモーター活性増加は、2~3 倍程度に留まることが分かった。しかしながら、この条件下でも Pet-1 結合活性は検出が容易ではなかった。現在までの知見では、*Nrsf* が高発現であることと、Pet-1 結合活性検出が容易ではない事との間に直接的な関連性があるかどうかは不明だが、*Nrsf* が様々な転写因子・転写関連タンパク質複合体を形成する足場タンパク質であることを考慮すると、*Nrsf* が Pet-1 結合活性そのものを抑制している可能性も否定できない。さらに、予備的実験ではあるが、TPH2-55 の NRSE に変異を入れた TPH2-9 レポーターベクターと、ヒト *TPH2* の 5' 非翻訳領域をほぼ全域除去した TPH2-100 レポーターベクターのプロモーター活性を比較すると、TPH2-100 >> TPH2-9 > TPH2-55 であった。このことは、RN46A 細胞では、*Nrsf*-NRSE システム以外の抑制系も機能している可能性を示唆しており、*Nrsf* 以外の抑制性因子を介した機構が Pet-1 結合活性検出を困難化している可能性も否定できないものと思われる。

(5)ラット *Nrsf* プロモーター領域の塩基配列を決定したところ、マウスの塩基配列と高い相同性を認めた。マウスの実験で、転写因子 Sp1 の DNA への結合を阻害する抗生物質、mithramycin A で細胞を処理すると、*Nrsf* mRNA が低下し、*Nrsf*-NRSE を介する転写抑制作用が減弱したとの報告に基づき、RN46A 細胞を種々の濃度の mithramycin A で処理し、TPH2-55 プロモーター活性変化を調べた。しかし、マウス培養細胞での結果と異なり、RN46A 細胞では、TPH2-55 プロモーター活性は増加しなかった。

(6)NRSF レベルがユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解により調節されるとの報告に基づき、RN46A 細胞へユビキチン-プロテアソーム構成タンパク質、*Nrsf* リン酸化酵素等、種々のタンパク質の過剰発現条件を検討したが、いずれも、TPH2-55 プロモーター活性を指標に調べた限り、有意な増加をもたらさなかった。そこで、一旦は *Nrsf* がユビキチン化されるが、直ぐに特異的脱ユビキチン化酵素 (USP7) が作用し、*Nrsf* が脱ユビキチン化することで、ユビキチン-プロテアソーム分解系によるタンパク質分解を免れている可能性を考え、RN46A 細胞を特異的 USP7 阻害薬 (P22077, HBX-41108) 存在下に培養し、TPH2-55 プロモーター活性変化を調べた。すると、USP7 阻害薬処理により TPH2-55 プロモーター活性が増加することが分かった。以上の結果から、RN46A 細胞

では、脱コピキチン化酵素(主として USP7)の活性が高く(脱コピキチン化亢進)、そのため、コピキチン化 Nrsf が速やかに脱コピキチン化され、プロアソーム分解を免れ、Nrsf 高発現レベルが維持される可能性が考えられた。

(7)マウス A1-mes 細胞においても、Nrsf は高発現した。A1-mes 細胞へ TPH-55 を導入すると、プロモーター活性は、強く抑制された。ジブチリル cAMP(1 mM)を添加した血清を含めぬ培地で培養すると、A1-mes 細胞は 5-HT 神経細胞へと分化することが報告されている。そこで、A1-mes 細胞を分裂増殖状態から分化状態へ移行させると、TPH2-55 プロモーター活性が増加した。また、内在性マウス *Tph2* プロモーター活性も、分化条件下での培養により、その活性を増加させた。

(8)本研究を総括すると、クロマチン免疫沈降法により、ラット縫線核由来 RN46A 細胞における中枢セロトニン神経細胞特異的転写因子 Pet-1 の標的遺伝子同定を試みたが、残念ながら、当初の研究目的は達成できなかった。平成 24 年度の進展状況が当初の計画を大きく下回ってしまった。その大きな要因は、予想外のことであったが、RN46A 細胞が Nrsf を高発現することであった。すなわち、RN46A 細胞では、Nrsf(および、おそらくは Nrsf 以外の抑制性因子も関与すると推定される)により、Pet-1 結合活性が抑制された可能性が否定できず、この Nrsf 高発現が RN46A 細胞における実験遂行の妨げになった可能性が考えられた。今後、Pet-1 標的遺伝子のクロマチン免疫沈降同定には、これらの抑制性因子を排除した実験系構築が必要である。この目的には、既存の 5-HT 系培養細胞系ではなく、iPS 細胞技術等、最新の発生物学的研究成果を取り入れた革新的な方法を応用して作製した細胞を用いることも選択肢の 1 つになるものと思われる。加えて Pet-1 過剰発現条件下でも Pet-1 結合活性検出は容易ではなく、従って、本研究から Pet-1 の標的遺伝子転写に及ぼす作用が、促進性なのか、あるいは抑制性なのかを明らかにすることができなかった。一方、本研究の副次的結果から、RN46A 細胞では Nrsf 脱コピキチン化酵素活性が亢進していることにより、Nrsf が持続的高発現レベルである可能性が示唆された。今後、Nrsf 脱コピキチン化酵素(USP7)活性と Nrsf 標的遺伝子転写活性との関連を研究する際、RN46A 細胞がモデル細胞として有用になるものと考えられる。加えて、本研究の副次的結果から、マウス中枢神経由来 5-HT モデル細胞、A1-mes 細胞においても Nrsf が持続的高発現しており、A1-mes 細胞の神経細胞への分化に応じて、Nrsf 発現レベルが低下し、標的遺伝子の転写が促進されることが分かった。当初の研究目的は達成できなかったが、副次的研究成果から、学術論文を公表することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Gentile MT, Nawa Y, Lunardi G, Florio T, Matsui H, Colucci-D'Amato L. Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) in a neuronal cell line: modulation by cell differentiation and NRSF/rest activity. *Journal of Neurochemistry*, 査読有、Vol. 123, No.6, 2012, pp.963-970 DOI: 10.1111/jnc.12004

〔学会発表〕(計 3 件)

那和 雪乃、ヒトセロトニン 4 受容体遺伝子発現調節機構: ERG、EGR および NF1 による調節、第 36 回 日本分子生物学会、2013 年 12 月 4 日、兵庫県神戸市

Nawa Y、Transcriptional regulation of the human serotonin type 4(5-ht4) receptor gene: identification and characterization of novel promoter and enhancer、Annual Meeting Neuroscience 2013、Nov. 13, 2013、San Diego、U.S.A.

- ③ Nawa Y、Transcriptional regulation of the human tryptophan hydroxylase-2 gene by Lmx1b in RN46A cells、Annual Meeting Neuroscience 2012、Oct. 14, 2012、New Orleans、U.S.A.

〔その他〕

ホームページ
聖マリアンナ医科大学大学院脳情報制御医学分野
<http://www.marianna-u.ac.jp/isotope/facilities/12541/012540.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 宏晃 (MATSUI, Hiroaki)
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・教授
研究者番号: 90181685

(2) 研究協力者

那和 雪乃 (NAWA, Yukino)
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・助教
研究者番号: 10549786