

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290035

研究課題名(和文)次世代型ターゲットトランスジェニック法の技術基盤の整備と実用性の検証

研究課題名(英文)Development and verification of the next generation transgenesis tools

研究代表者

大塚 正人(OHTSUKA, Masato)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90372945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：既知の遺伝子座位へ1コピーの目的遺伝子を導入することで、期待通りの遺伝子発現を示すトランスジェニック(Tg)マウスを得ることが可能な独自のTgマウス作製手法(PITT法)について、本研究にてCre-loxP系とPhiC31インテグラーゼ系を同時に作用させる「改良型PITT法(i-PITT法)」を開発することにより、目的遺伝子の挿入効率の向上に成功した。また、複数のドナーベクターを同時に顕微注入することで、“一度に複数系統のTgマウスを得る”ことにも成功している。本技術については標準プロトコルを作成して公開するとともに、C57BL/6N系統の種マウスは理研BRCに寄託した。

研究成果の概要(英文)：We recently developed technology termed “pronuclear injection (PI)-based Targeted Transgenesis (PITT)” that allows targeted insertion of single-copy transgene into the predetermined locus through PI. PITT method enables to generate Tg mice showing reliable transgene expression pattern. Here, we developed an improved-PITT (i-PITT) system by combining Cre-loxP and PhiC31-attP/B systems directly under C57BL/6N inbred strain. The targeted Tg efficiency in the i-PITT was improved up to 67%, which is by-far the best Tg rate reported. Furthermore, the system could generate multiple Tg mice simultaneously: injection of up to three different Tg cassettes in a single injection session into as less as 181 zygotes resulted in production of all three separate Tg DNA containing targeted Tg mice. Standard protocol for PITT was published and the seed mouse strain is available from RIKEN BRC.

研究分野：マウス遺伝子工学

キーワード：トランスジェニックマウス PITT Cre-loxP PhiC31 Rosa26

1. 研究開始当初の背景

遺伝子機能解析や、病態解析・治療薬開発に有用な疾患モデル動物開発を行う上で、動物個体への遺伝子導入技術は必須である。Tg マウスは、それらの目的の為に頻繁に使用されており、医学・生物学を含む幅広い分野で不可欠なツールとなっている。その作製法は、受精卵に目的遺伝子を顕微注入する方法が一般的である。しかしこの場合、遺伝子の挿入位置やコピー数を制御できないので、結果として、得られた Tg 系統間で導入遺伝子発現がばらつく(目的遺伝子が全く発現しないことも)場合や、他の遺伝子を壊していることもある。そのため、複数の Tg 系統を樹立して表現型が統一しているかを調べる必要がある等、労力やコスト的に負担が大きい。しかしながら、1980 年に Tg 作製手法が開発されて以来、大きな技術的革新はなかった。

そのような状況の中、我々は、上述したランダム挿入に基づく Tg マウス作製法の問題点の克服を目指し、受精卵への顕微注入を介して特定のゲノム領域(*Rosa26* 座位)に 1 コピーの目的遺伝子を導入する Pronuclear injection-based Targeted Transgenesis (PITT) 法を開発した(Ohtsuka ら, *Nucleic Acids Res* 2010; *Transgenic Res* 2012; *Exp Anim* 2012)。本手法で作製されたターゲット Tg マウスは、基本的に全て期待通りの遺伝子発現を示すことから、複数系統から理想的なものを選ぶ労力やコストを要せず、結果として使用するマウス個体数の削減に繋がる為、動物愛護の点からも優れている。

我々はその後も PITT 法の技術改良を進め、遺伝子挿入効率の大幅な改善に成功し(4-5% [2010 年の報告時] から 20% に改善)、さらに世界的基準である C57BL/6N 系統の遺伝的背景での「種マウス (PITT 法を可能とする目印がゲノムに挿入されたマウス) を得ることに成功した。

2. 研究の目的

我々は、上述した独自のシステムを更に発展させ、PITT 法を次世代型 Tg マウス作製法として広めることにより、国内外の研究者に成果やリソースを還元していきたいと考えた。そのために、(1) B6 背景の新しい種マウスにおける PITT 法の確立(各組換え系の条件設定を含む)、(2) それを利用した誘導型且つ組織特異的な遺伝子発現マウス作製、(3) ゲノム編集手法を用いた *Hprt* 種マウス作製、(4) 外部施設での PITT 法の実施と標準プロトコル作成、を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B6 背景の種マウスにおける PITT 法の確立
新たに作製した C57BL/6N 背景の種マウスには、既報の種マウスで使用した変異 loxP の他に、attP、変異 FRT 等の目印が導入されており、Cre の他に PhiC31 インテグラーゼ、FLP を用いたゲノム改変も可能な独自のデザ

インとなっている。これらがマウス受精卵で働くことを確認すると同時に、適切な組換え酵素濃度を決定する。具体的には、種マウス雄由来の精子を B6N 雌マウスから得た未受精卵と体外受精(IVF)して得られた受精卵に、ドナーベクター(挿入された際に赤蛍光遺伝子が発現)を顕微注入する。仮親の卵管に移植後、胚を回収して蛍光観察、及び DNA タイピングで挿入効率を調べる。また、実際に PITT 法による Tg マウス作製を行う。

(2) 誘導型且つ組織特異的な遺伝子発現マウス作製

2 段階の連続した PITT 法を用い、ドキシサイクリン(Dox)誘導型で同時に Cre-loxP で組織特異的な遺伝子発現を可能とする Tg マウス作製法の確立を行う。

(3) ゲノム編集法を用いた *Hprt* 種マウス作製
種マウス用コンストラクトを X 染色体上の *Hprt* 遺伝子座位上流にノックインする。

(4) 外部施設での PITT 法の実施と標準プロトコル作成

東海大学以外に、分担研究者、研究協力者が所属する施設で、種マウスを用いた PITT 法を行う。その為に、各施設に種マウスを輸送する。理研 BRC に関しては、マウス個体の移動ではなく精巣上体尾部での輸送を行い、それから回収した精子を用いた IVF で得られた受精卵に、ドナーベクターの顕微注入を行う。また、標準プロトコルの作成を行う。

4. 研究成果

(1) B6 背景の種マウスにおける PITT 法の確立
Cre と PhiC31 系を併用することによる遺伝子導入効率の改善

細胞レベルでの実験から、Cre 酵素と PhiC31 酵素を同時に施すことにより、各酵素を単独で作用させるよりも高効率で目的遺伝子を挿入できる可能性を示唆するデータが得られた。そこで、これを受精卵への顕微注入法すなわち PITT 法に応用し、更なる遺伝子挿入効率の改善を目指した。

まず PhiC31 mRNA を調製した(iCre mRNA は既に調製済み)、独自の PhiC31 mRNA 調製用ベクター(pBBK: pcDNA3.1 EGFP-poly(A83))の EGFP 遺伝子部分を、コドンが最適化された PhiC31o に置換したものを大量調製して *XbaI* 切断後、mRNA 合成の鋳型として用いた。*in vitro* mRNA 合成の結果、十分量の mRNA (200µg 程度)を得ることができた。次に、PhiC31o mRNA を用い、至適濃度を検討した。5~45 ng/µl の濃度の PhiC31o mRNA を DNA ベクター(pBER: *Rosa26* 座位に挿入された場合、赤蛍光を示すもの)と共に種マウスから得た受精卵に注入し、blastocyst 胚まで培養することで発生効率、及び遺伝子挿入の有無を調べた。その結果、濃度の上昇に応じて発生効率が減少することが分かったが、5 ng/µl 以

上の濃度では胚が発生しなくなる iCre mRNA と比較して、PhiC310 の毒性は低いようであった。

次に、Cre 酵素と PhiC31 酵素を同時に施すことにより、各酵素を単独で作用させるよりも高効率で目的遺伝子を挿入できるか否かを調べた。これまでの濃度最適化実験の結果をもとにして、iCre mRNA 濃度を 0.5~1.0 ng/ μ l に、PhiC310 mRNA 濃度を 7.5~15 ng/ μ l で使用することとした。上述の pBER ドナーベクターと mRNA を種マウス由来の受精卵に共注入した結果、iCre 単独、あるいは PhiC310 単独で注入した場合よりも、iCre と PhiC310 を混合して注入した場合の方が、*Rosa26* 座位への挿入効率が高いようであった。この結果から、*in vivo* においても Cre 酵素と PhiC31 酵素を同時に施すことにより、高効率で目的遺伝子を挿入できることが示唆された。また、Cre 酵素と PhiC31 酵素間での挿入効率には大きな差はないようであった。

C57BL/6N 系統の種マウスによる Tg マウス作製システムの確立

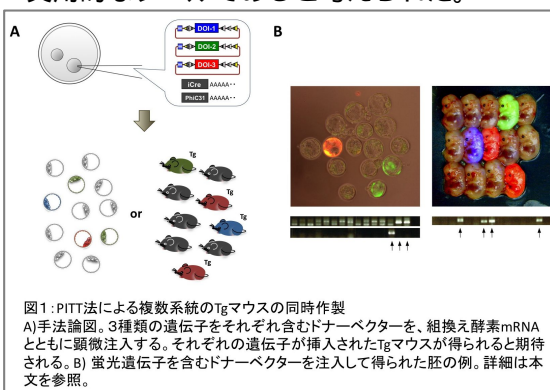
実際に着床後胚あるいは Tg マウス個体として、目的の組換え体を得ることができるか否かを調べた。そのために、上述の pBER ドナーベクターを iCre と PhiC310 の mRNA を混合したものと一緒に種マウス由来の受精卵に注入した。注入胚は偽妊娠マウスの卵管に移植して 14.5 日胚、あるいは 18.5 日胚まで発生させ、組換え体の産出効率を調べた。また、iRFP 遺伝子発現 Tg マウス作製を目指し、iRFP 遺伝子発現カセットを有するドナーベクター (pBGT) を構築して Tg マウス作製を進めた。100-150 個の受精卵に顕微注入することにより、目的のターゲットトランスジェニックマウスが得られることが分かった。これは、初期の PITT 法では 300 個程度の受精卵に顕微注入しなくてはならなかったことを考えると、労力の大幅な軽減に繋がるものと言える。その挿入効率は 7.1 から 25.0% であり、着床前胚での結果 (平均 54%) と比較すると低いように思われる。その理由は不明であるが、遺伝子挿入胚は挿入されなかった胚よりも着床後の発生に影響が生じやすい可能性、注入した DNA/RNA 溶液の質的な問題の可能性、等が考えられる。いずれにしても、今回新たに作製された C57BL/6N 系統の種マウスを用いて、目的のターゲットトランスジェニックマウスが効率良く作製可能であることを示すことができた。本手法を改良型 PITT 法 (*i*-PITT 法) と命名した。

複数ラインの Tg マウスの同時作製法開発

遺伝子の注入に用いた受精卵は挿入遺伝子座位 (loxP や attP 等のタグが付加された部位) をゲノム上に 1 箇所のみ有することから、複数のドナーベクターを混合して注入した場合でも、そのうちの 1 種類のみが目的遺伝子座位に挿入されると期待される。そこで、

2~3 種類のドナーベクターを混合してインジェクション (Cre-loxP 系と PhiC31 系を併用) することで、異なるターゲット Tg マウスを同時に作製することが可能であるかについて検討した。具体的には、プロモーターを含まない "蛍光遺伝子-polyA" カセットを有する、pBGW (mCitrine)、pBDR (tdTomato)、pBGV (mCFP) の 3 種類のドナーベクターを、Cre 酵素と PhiC31 酵素の mRNA と混合し、2013 年度までに開発した C57BL/6N 純系統の種マウスから得た受精卵に顕微注入を行った。もし、各ドナーベクターが目的の遺伝子座位 (*Rosa26* 座位) に挿入された場合、ドナーベクターが有する蛍光遺伝子が発現し、mCitrine は黄緑蛍光、tdTomato は赤蛍光、mCFP は青蛍光で確認することが可能である。

まずは、顕微注入胚を胚盤胞期まで培養し、蛍光発現の有無を顕微鏡下で観察した。その結果、3 種類の遺伝子のうち 2 種類 (黄緑蛍光) について挿入された胚を同時に得ることができた。次に、ドナーベクター注入卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、13.5 日胚で回収して蛍光観察を行った。回収した胚の中には、黄緑蛍光を示す胚、赤蛍光を示す胚、青蛍光を示す胚のいずれも含まれており、3 種類の遺伝子の Tg マウスを 1 回の顕微注入実験で作製することが可能であることが示された (図 1)。また、蛍光遺伝子以外の 2 種類の遺伝子 (iRFP [in pBGT]、Dre [in pBGX]) に対する Tg マウス個体を同時に作製することにも成功している。その Tg マウス作製効率は 17.6%~28.6% と高いものであり、十分に実用的なレベルであると考えられた。



本研究成果から、複数の Tg マウスを 1 日のインジェクションで作製する手法が現実的であることが示され、Tg マウス作製に要する時間と労力の大幅な削減に繋がるものと期待された。これは、ハイスループットな Tg マウス作製に結びつくものである。本成果は英文原著論文として発表した (Ohtsuka et al. BMC Genomics 2015)。また、種マウスは国内外の各種施設に譲渡するとともに、2015 年 9 月に理研 BRC 企画の「Mouse of the Month」でも取り上げられた (http://mus.brc.riken.jp/en/mouse_of_month/sep_2015_mm)。

(2) 誘導型且つ組織特異的な遺伝子発現マウス作製

2段階の連続した PITT 法を用い、誘導型且つ組織特異的な遺伝子発現を可能とする Tg マウス作製法の確立を目指した。1段階目の PITT 法 (Cre による) で Dox 誘導型発現を可能とする Tg マウスを作製した。325 個の種マウス由来の受精卵に誘導型且つ組織特異的発現カセットを挿入したドナーベクターと iCre mRNA を注入した。その結果、45 個体の産仔を得て、その中の 3 個体が目的の Tg マウス個体であった。次世代への目的遺伝子の伝播も確認しており、さらに FLPe Tg マウスとの交配によって余分配列の除去にも成功した (これにより、新規種マウスの FLP-FRT 系が正常に機能することが確認された)。

次に、交配によってホモマウスを作製し、2段階目の PITT 法 (PhiC31 による) を行った。その結果、"TRE-CAG-*loxP*-eGFP-pA-STOP-*loxP*-lacZ-(pA)-*rox*-*loxP*-tdTomato-*rox*-IRES-tTR/KRAB-pA (アリル 1 とする)" を有する Tg マウスを得ることに低効率ながら成功した。しかしながら、このマウスから、"TRE-CAG-*loxP*-eGFP-pA-STOP-*loxP*-lacZ-(pA)-*rox*-IRES-tTR/KRAB-pA (アリル 2 とする)" のマウス (Dre 発現マウスと交配して *rox* 間の配列を除去して作製できる) を得ることができず、2015 年度までにコンディショナルな発現系を検証することができなかった。その理由は、Dre 発現マウスが 2015 年 6 月以降に全く出産をせず (それまでは正常に交配可能であった) アリル 1 の Tg マウスとの交配で次世代が得られなかったためである。最近、Dre 発現マウスが再び繁殖し始めたため、実験を再開する予定である。

(3) ゲノム編集法を用いた *Hprt* 種マウス作製

CRISPR/Cas9 系を用いて、種マウス用コンストラクトを *Hprt* 遺伝子座位上流にノックインすることを目指した。当初、CRISPR/Cas9 系の東海大学での実施例はまだなかったこともあり、まず、東海大学における系の確立を目指した。CRISPR 系をマウスで行うために、Cas9 mRNA 調製用ベクター (pBGK: pcDNA3.1 EGFP-poly(A83) の EGFP 遺伝子部分を、コドンが最適化された Cas9 に置換したもの) を大量調製して *Xba*I 切断後、mRNA 合成の鋳型として用いた。in vitro mRNA 合成の結果、十分量の mRNA を得ることができた。sgRNA については、共同研究者から送っていただいたベクターを用いて調製した。本研究とは異なる共同研究プロジェクトにて、これらの RNA を用いて実際に CRISPR/Cas9 によるノックアウトマウス作製に成功し、東海大学で CRISPR/Cas9 系を確立できた。

Hprt 座位については、2カ所にターゲット部位を設計し sgRNA を合成した。変異 *loxP* 配列と *attP* 配列 (及び *Hprt* 近傍標的領域の相同配列) を有する ssDNA (200 塩基) をカスタムオーダーし、Cas9 mRNA と sgRNA と混合 (各 20ng/μl、10ng/μl、10ng/μl の濃度) して B6N 系統のマウス受精卵 91 個に顕微注入

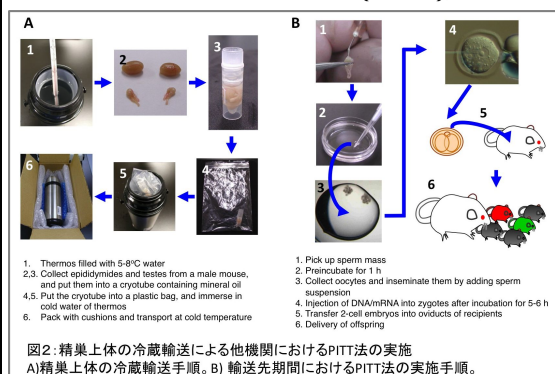
した。20 匹の産仔が得られたため遺伝子型タイプングを行ったところ、複数の ssDNA 挿入胚が得られたものの、全てにおいて挿入配列または挿入され方が正確ではなかった。遺伝子座位によっては修復のされ方が正確ではないことがある、使用した ssDNA における相同配列が短すぎる (両端 36 塩基ずつ) などのいくつかの理由が考えられた。

一方で、*Hprt* 座位ではなく *Rosa26* 座位に異なるタグを付加した PITT 法用の種マウスの作製に CRISPR/Cas9 系を用いて成功しており、英文原著論文としても発表済みである (Quadros et al. *FEBS Open Bio*. 2015)。

(4) 外部施設での PITT 法の実施と標準プロトコル作成

これまで PITT 法は、開発者である申請者の所属施設 (東海大学) でのみしか実行例がなかった。本研究では、共同研究を行う他施設 (理研 BRC) での PITT 法を実行することで再現性の検討を行う。また、種マウスの精巣上体の輸送から得た IVF 卵で顕微注入を実施することで、種マウス個体を維持することなく迅速に PITT 法を行うシステムを確立することを目指した。

マウスの精巣上体の冷蔵輸送に関しては、分担研究者である理研 BRC の持田技師が以前に論文で報告しており、その手順に従って行った。具体的には、ミネラルオイルを含むチューブに、東海大学にて PITT 法用の種マウス (ホモ) 雄個体 2 匹より採取した精巣上体を入れ、そのチューブを 5-8 の水の入った水筒に加えて宅急便で理研 BRC に冷蔵輸送した。理研 BRC にて精巣上体から精子を回収し、C57BL/6N 雌から得た未受精卵と体外受精 (IVF) を行い、得られた受精卵にドナーベクターと組換え酵素 mRNA を混合した溶液を注入した。注入胚を偽妊娠マウスに移植後に得られた 13.5 日胚について解析を行った。その結果、9.1%の個体が目的の Tg マウスであることが分かり、本手法が問題なく実施可能であることが示唆された (図 2)。



さらに PITT 法は、海外の共同研究先 (ネブラスカ大) でも動くことを確認している。標準プロトコルに関しては、すでに Ohtsuka *Methods in Molecular Biology* (2014) で発表しただけでなく、現在も i-PITT 法に関するプロトコル論文を投稿中である。

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 23 件)

Miura H., Sato M., Ohtsuka M. (8 名中 8 番目) Assessment of artificial miRNA architectures for higher knockdown efficiencies without the undesired effects in mice. *PLoS ONE* 10: e0135919 (2015) 査読有 DOI:

Ohtsuka M., Mochida K., Gurumurthy C. B. (12 名中 1 番目) One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). *BMC Genomics* 16:274 (2015) 査読有

Furukawa S., Ohtsuka M., Miura H. (11 名中 5 番目) Establishment of immortalized mesenchymal stem cells derived from the submandibular glands of tdTomato transgenic mice. *Exp. Ther. Med.*, 10, 1380-1386 (2015) 査読有

Quadros R.*, Harms D.*, Ohtsuka M.* and Gurumurthy C. B. Insertion of sequences at the original provirus integration site of mouse ROSA26 locus using the CRISPR/Cas9 system. *FEBS Open Bio.*, 5, 191-197 (2015) *equal contribution 査読有

大塚正人、佐藤正宏: トランスジェニックマウスの基礎と応用. *小児外科*. 46, 571-574. (2014) 査読無

Ohtsuka M., Miura H., Sato M. (8 名中 1 番目) Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Res.*, 22, 873-875 (2013) 査読有

[学会発表](計 63 件)

三浦浩美、木村穰、大塚正人 顕微注入法を介したターゲットトランスジェネシスによるノックダウンマウス作製 第 29 回モロシヌス研究会 2015 年 7 月 3 日~4 日 かんぼの宿 有馬(兵庫県・神戸市)

三浦 浩美、木村 穰、佐藤 正宏、大塚 正人 人工 miRNA を用いたマウス遺伝子ノックダウンシステムの検証 第 62 回日本実験動物学会総会(大会) 会期:平成 27 年 5 月 28 日~30 日 会場:京都テルサ

(京都府京都市)

大塚 正人、三浦 浩美、佐藤 正宏、木村 穰 マウス受精卵への顕微注入を介したターゲットトランスジェネシス法の改良 第 62 回日本実験動物学会総会(大会) 会期:平成 27 年 5 月 28 日~30 日 会場: 京都テルサ(京都府京都市)

田村 沙亜希、大塚 正人、三浦 浩美、松阪 泰二、安岡 有紀子 *Rosa26* 遺伝子座位における組織特異的プロモーター活性の検証 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

三浦 浩美、大塚 正人 薬剤副作用の発症機序解明の為に、HLA 遺伝子発現細胞と HLA トランスジェニックマウスの作製 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hiromi Miura, Minoru Kimura, Masahiro Sato, Masato Ohtsuka Presence/absence of a marker gene in artificial microRNA expression constructs affects knockdown efficiencies in a targeted transgenic system. 12th Transgenic Technology Meeting (TT2014) The Assembly Rooms, Edinburgh (Scotland, United Kingdom), 6-8 October 2014

Channabasavaiah Gurumurthy, Rolen Quadros, Donald Harms, Masato Ohtsuka Targeted insertion of short sequences in the mouse ROSA 26 locus using CRISPR/Cas9 system. 12th Transgenic Technology Meeting (TT2014) The Assembly Rooms, Edinburgh (Scotland, United Kingdom), 6-8 October 2014

Masato Ohtsuka, Hiromi Miura, Minoru Kimura, Ayako Isotani, Masahito Ikawa, Masahiro Sato, Channabasavaiah Gurumurthy Concurrent production of multiple targeted transgenic mouse lines with C57BL/6N genetic background by improved PITT. 12th Transgenic Technology Meeting (TT2014) The Assembly Rooms, Edinburgh (Scotland, United Kingdom), 6-8 October 2014

大塚正人 マウス受精卵への顕微注入法を介した *Rosa26* 遺伝子座位へのターゲットトランスジェネシス 第 28 回モロシヌス研究会、6 月 27 日~ 28 日 2014、国立遺伝学研究所講堂 / 修善寺総合会館(静岡県・伊豆市)

大塚 正人, 三浦 浩美, 磯谷 綾子, 伊川 正人, 佐藤 正宏, 木村 穰 C57BL/6N を遺伝的背景に持つターゲットトランスジェネシス用種マウスの作製と評価 第61回日本実験動物学会総会 in 日本実験動物科学技術 さっぽろ2014 平成26年5月15日~17日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Hiromi Miura, Masato Ohtsuka
Generation of Knockdown Mice Using Pronuclear Injection-Based Targeted Transgenesis: Advantages and Limitations. The 27th International Mammalian Genome Conference, Salamanca (Spain), September 15-18, 2013

大塚正人、三浦浩美、佐藤正宏、木村穰 受精卵への iCre mRNA 注入によるターゲットトランスジェネシス法(PITT法)の効率改善 第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日~17日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

〔図書〕(計2件)

Ohtsuka M. Development of pronuclear injection-based targeted transgenesis in mice through Cre-*loxP* site-specific recombination. in *Mouse Genetics: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Chapter 1, 3-19 (Humana press) (2014) 査読無

大塚正人、角田茂：遺伝子改変法部位特異的組換え酵素システム．ES iPS細胞実験スタンダード(中辻憲夫 監、末盛博文 編)羊土社 pp.288-299 (2014) 査読無

〔その他〕

ホームページ等

<http://masato2.wix.com/ohtsuka-lab>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 正人(OHTSUKA, Masato)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：90372945

(2)研究分担者

持田 慶司(MOCHIDA, Keiji)
理化学研究所・バイオリソースセンター・
専任技師
研究者番号：60312287

(3)研究分担者

設楽 浩志(SHITARA Hiroshi)
東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・主任基盤技術研究職員