

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462691

研究課題名(和文) マウス皮膚上皮SP細胞から角膜上皮細胞への形質転換誘導因子の同定

研究課題名(英文) An examination of factors for transdifferentiation of mouse epidermal sp cells into corneal epithelial cells

研究代表者

白石 敦 (Shiraishi, Atsushi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90314963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス表皮細胞から角膜上皮細胞への形質転換に及ぼす輪部実質由来因子の関与を検討した。輪部実質細胞(MLSF)のトランスクリプトーム解析により、複数のWnt阻害因子がMLSFで高発現することが明らかとなった。Wnt阻害因子(sFRP2)添加後の表皮細胞において、K12、PAX6遺伝子発現量の増加傾向を認め、Wntシグナルの形質転換への関与が示唆された。輪部実質細胞を含むゲル上で表皮sp細胞を培養する三次元培養モデルにおいてもK12遺伝子の発現を認めた。Wntシグナル調節に同時に複数の因子が関与することも考えられ、今後これら因子の組み合わせについて、培養モデルを用いた詳細な検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The effect of limbal stromal cell-derived factors on the transdifferentiation of mouse epidermal cells (MECs) into corneal epithelial cells was examined. The transcriptome analysis of mouse limbal stromal fibroblast (MLSF) showed several Wnt-related factors were highly expressed in MLSF. The effect of Wnt-related factors on primary cultured MECs was examined, and it was shown a tendency to increase the expression of K12 and PAX6 genes by addition of sFRP2. On the other hand, the K12 gene expression was observed in mouse epidermal sp cells that were cultured in a three-dimensional culture model using limbal fibroblast embedded collagen-gel, and it was shown that the culture model was an useful tool for studying the interaction between epithelial and stromal cells in transdifferentiation. Since multiple factors might simultaneously be involved in the regulation of Wnt signaling, it was considered that detailed study using the culture model was necessary for combinations of these factors.

研究分野：眼科

キーワード：角膜上皮細胞 再生医療 形質転換

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮細胞の再生医療は他分野に先駆けて、培養角膜上皮シート(培養口腔粘膜上皮シート)移植が開発、臨床応用され、比較的良好な治療成績が報告されている。さらに自己角膜上皮細胞移植を目指して、iPS細胞を使った臨床応用に向けて研究が進められている。しかしながら、遺伝子導入を伴うiPS細胞の臨床応用には超えなければならない問題点が多くある。一方、組織幹細胞の多分化能または可塑性(plasticity)に関する研究が盛んに報告されるようになり、角膜分野においても、表皮に含まれる幹細胞(毛包幹細胞)から角膜上皮様細胞への形質転換が可能であることが示されている。皮膚はヒトの持つ最大の器官であり、細胞の採取も比較的容易であることから、我々は、遺伝子導入を行わず、皮膚上皮細胞を角膜上皮細胞に形質転換させ、臨床応用するという計画を進めている。

2. 研究の目的

我々はすでにマウスモデルにおいて、遺伝子操作を必要とせず、環境因子のみで皮膚上皮細胞を角膜上皮細胞に形質転換することを見出している。自己の細胞(表皮細胞)から形質転換させた角膜上皮細胞を用いることが可能となれば、臨床的効果は飛躍的に改善されると推測される。本研究では、特定の因子添加で表皮細胞から角膜上皮細胞への形質転換を行うことを目的に、角膜輪部実質細胞由来因子の関与について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス表皮細胞

生直後のC57BL/6マウスの背部より採取した皮膚全層をPBSで洗浄後、dispase処理(250U/mL Dispase II, 4, 16h)を行い表皮を剥離、TrypLE Express(Life Technologies)にて処理(37, 10min)し、単一細胞とした(マウス表皮細胞)。マウス表皮細胞の初代培養には上皮前駆細胞用培地(CnT-Prime, CELLnTEC)を用い、コラーゲンコート培養プレート(IWAKI)で培養した(37, 2% CO₂)

(2) マウス表皮 side population (sp) 細胞

マウス表皮細胞を2% FBSおよび10 mM HEPESを含むHBSSに 1×10^6 cells/mlの密度で懸濁し、Hoechst 33342 (5 µg/ml)を加えて、37で90分間、暗下で染色を行った。遠心分離(1,000 rpm, 5min)後、 5×10^6 cells/mlになるよう再懸濁し、fluorescence activated cell sorting (FACS, Beckman Coulter)により分離を行った。FACSによるsp細胞の分離に当たっては、低蛍光の2%の分画を分取し、上皮前駆細胞用培地(CnT-Prime)に懸濁した(1×10^4 cells/ml)

(3) 輪部実質由来因子の解析

マウスの角膜輪部および角膜中心部実質をコラーゲナーゼ処理後、細胞を回収しサブコンフルエントまで培養(10%FBS/DMEM, 5 days) RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出した。Agilent Expression Array (SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit)にてトランスクリプトーム解析を行い、39,430 遺伝子および16,251 lincRNAsについて角膜輪部実質由来線維芽細胞(MLSF)と角膜中心部実質由来線維芽細胞(MCSF)の比較を行った。2回のトランスクリプトーム解析の結果において輪部で2倍以上の発現を認めた遺伝子の中から分泌タンパク質または細胞外マトリクスの構成タンパクをコードする遺伝子、またその可能性の高い遺伝子を選択し、Real-time PCRによる確認を行った。

(4) 表皮由来細胞の分化に及ぼすWnt関連因子の影響

MLSFのトランスクリプトーム解析により高発現を認めたWnt関連因子が上皮細胞の分化に及ぼす影響について検討するため、マウス表皮細胞を上皮前駆細胞用培地(CnT-Prime)にて培養、sFRP2(10 nM)またはDKK3(10 nM)を添加後24時間培養した。RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出し、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies)にてcDNAを合成、real-time PCRにより、K12 遺伝子、PAX6 遺伝子発現量を測定した。

(5) 三次元培養

輸入角膜の角膜上皮をディスペラーゼ処理により除去し、内皮をピンセットでデスメ膜ごと取り除いた後、角膜輪部実質(2mm幅)と角膜実質を切り分けた。実質組織は2mm角に切った後、10% FBSを含むDMEMで培養した(37, 2% CO₂)。線維芽細胞の増殖が、直径1cm程度の範囲に広がった時点で継代、サブコンフルエントまで培養し、2継代目の細胞をコラーゲンゲルの作製に用いた。ヒト角膜実質線維芽細胞(HCF)またはヒト輪部実質線維芽細胞(HLF)を 1×10^5 cells/mlの密度でI型コラーゲン(終濃度0.8 mg/ml、新田ゼラチン)と混和し、Ascorbic acid (50 µg/ml) および10% FBSを含むDMEMで5日間培養した。収縮後のコラーゲンゲル上にマウス表皮細胞(1×10^6 cells/cm²)または表皮sp細胞(1×10^4 cells/cm²)を播種した。マウス表皮細胞の培養に当たっては、上皮前駆細胞用培地(CnT-Prime)で2日間培養した後、2%FBSを含む上皮分化溶媒値(CnT-Prime 2D)で3日間培養した。表皮sp細胞の培養には5% FBSを含むDMEM/F12(1:1)を用い、3日、7日、または14日間の培養後、培養組織を半分に分け、一方はパラホルムアルデヒド(PFA)にて固定し、残りの組織からは上皮細胞を回収、上皮及およびコラーゲンゲル

(線維芽細胞)から RNA を抽出、cDNA の合成を行い、K10 および K12 の発現について、リアルタイム PCR による検討を行った。

4. 研究成果

(1) 形質転換に及ぼす輪部実質由来因子の影響

マウスモデルでの検討の結果、表皮由来細胞から角膜上皮様細胞への形質転換は、角膜輪部において認められ角膜中心部では見られないこと、さらに、凍結融解後の輪部実質上では形質転換が見られなくなることから、形質転換に輪部実質細胞の存在が必要であることが示されている。そこで、角膜輪部での形質転換に関与する候補因子について検討することを目的に、MCSF と MLSF のトランスクリプトーム解析を行い、MLSF で有意に高発現を認めた因子を調べた結果、分泌タンパク質のコード遺伝子が 21 種、細胞外マトリクスの構成タンパク質をコードする遺伝子が 15 種含まれていることが明らかとなった。また、分泌タンパク質のコード遺伝子の内、5 種類は Wnt シグナルに関連する因子であった。本研究ではまず、角膜輪部で特に高発現を認めた Wnt 関連因子である secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2) または dickkopf homolog 3 (DKK3) 添加後のマウス表皮細胞における K12 遺伝子および PAX6 遺伝子の発現について検討した。その結果、sFRP2 添加群ではコントロールに比べ、K12 遺伝子発現量が 1.5 倍、PAX6 遺伝子発現量が 1.6 倍であり、両遺伝子ともに発現量増加の傾向を示し、角膜輪部における形質転換に Wnt シグナルが関与する可能性が考えられた。(図 1) 一方で、DKK3 添加後のマウス表皮細胞では、K12 遺伝子発現量の増加は認められないことが分かった。

Wnt シグナルは、種々の遺伝子発現を調節することが知られるシグナル伝達経路であり、Wnt/ β -catenin signaling の活性化は角膜上皮細胞の増殖を促進し、一方で、Wnt 阻害因子のノックアウトマウスでは角膜上皮において表皮特異的分化マーカーの発現、皮脂腺および毛包の形成が起こることが知られている。このように、Wnt 阻害因子のノックアウトが角膜上皮の表皮様分化を促進することからも、Wnt シグナルの調節が角膜上皮の分化に関与する可能性が考えられる。sFRP2 および DKK3 はいずれも Wnt 阻害因子として知られるが、sFRP は Wnt リガンドに結合し、Wnt の受容体への結合を阻害するのに対し、DKK は LRP と特異的に結合することで、Wnt シグナルを阻害することが知られている。sFRP2 と類似の Wnt シグナルのアンタゴニストには sFRP1-5、WIF-1 等が知られており、我々は、WIF-1 についても角膜輪部で高発現する因子の 1 つとして同定している。一方、Wnt シグナルの調節には、これら因子が同時に働くことが考えられることから、複数因子の組み合わせを含めた詳細な検討が必要で

あると考えられる。

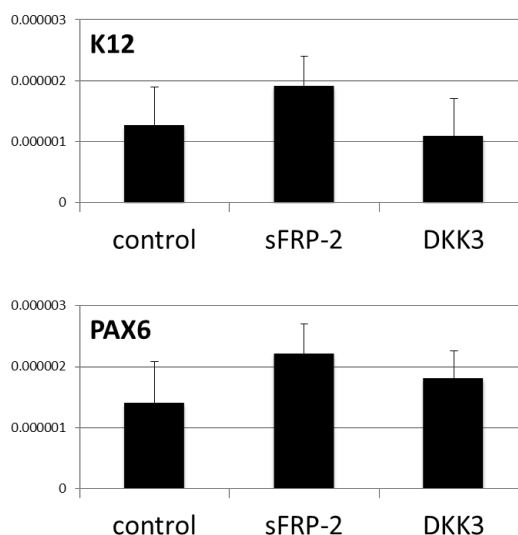


図 1. マウス表皮細胞の K12, PAX6 遺伝子発現に及ぼす Wnt 阻害因子の影響

(2) 三次元培養モデルの検討

我々は、ヒト線維芽細胞を I 型コラーゲンと混合して培養したコラーゲンゲル上で角膜上皮細胞を培養することで、正常角膜と類似した三次元培養角膜モデルを作製することに成功し、角膜上皮の重層化過程における液性因子を介した上皮-実質間の相互作用について研究を行い、この培養系における上皮-線維芽細胞間の相互作用が、上皮細胞の分化に必須であることを報告した (Kobayashi, et al. *Exp Eye Res.* 2015. 135:109-17.)。この三次元培養モデルを応用し、角膜上皮細胞への形質転換における上皮-実質間相互作用を検討するため、マウス表皮細胞を、ヒト角膜輪部実質線維芽細胞 (HLF) を含むコラーゲンゲル上に播種し、培養後の K10 および K12 遺伝子の発現を調べた。(図 2) この結果、I 型コラーゲンでコートしたプラスチック上での培養と比べ、K10 遺伝子の発現量に大きな違いは認められなかったが、三次元培養モデルにおける K12 遺伝子発現量はプラスチック上での培養の約 5 倍であり、角膜上皮様細胞への形質転換に、輪部実質由来細胞の因子が関与する可能性が示唆された。しかしながら、本培養モデルでは、種々の分化段階の細胞が含まれており、より未分化な細胞を用いた培養モデルを作製するため、表皮 sp 細胞の使用について検討を行った。

Side population (sp) 細胞は Hoechst で染色した時の低蛍光の細胞群として得られ、幹細胞を比較的高い割合で含むことが報告されている。Hoechst 33342 で染色したマウス表皮細胞から低蛍光の約 2% の分画を FACS により分取し、1 匹当たり約 1×10^4 cells の sp 細胞を得ることができた。得られた表皮 sp 細胞はプラスチック上での培養で細胞サイズの小さなコロニーを形成した。

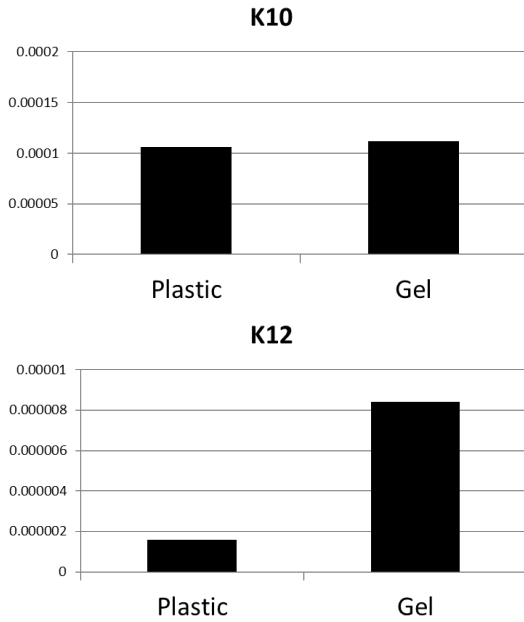


図 2 . 角膜輪部実質線維芽細胞 (HLF) を含むコラーゲンゲルを用いた三次元培養モデルにおける K10, K12 遺伝子の発現

そこで、マウス表皮 sp 細胞を、ヒト角膜輪部実質線維芽細胞 (HLF) を含むコラーゲンゲル上に播種し、培養後の K10 および K12 遺伝子の発現を、経時的に調べた。(図 3) K10 遺伝子の発現は、培養 3 日目に比べて、7 日目以降では減少した。一方で K12 遺伝子の発現は、培養 3 日目では検出されなかったのに対し、7 日目および 14 日目に検出されることが分かった。このように、ヒト角膜輪部線維芽細胞を含むコラーゲル上でマウス表皮 sp 細胞を培養することで K12 遺伝子の発現が認められたことから、角膜上皮細胞への形質転換における上皮-実質間相互作用を検討する上で有用なツールであると考えられた。

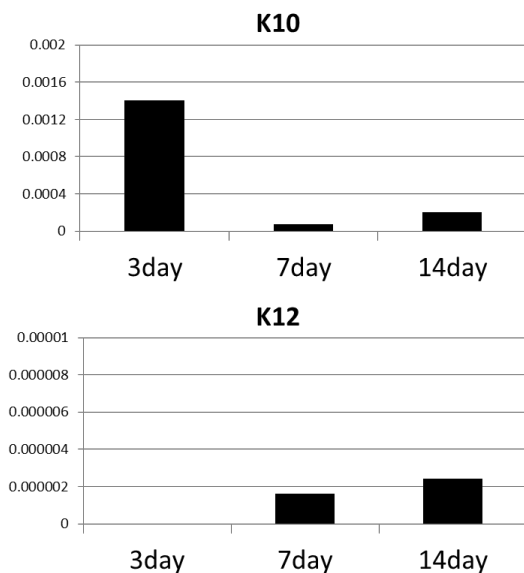


図 3 . マウス表皮 sp 細胞から角膜上皮様細胞への分化誘導

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

組織幹細胞の多分化能または可塑性 (plasticity) に関する研究が盛んに報告されるようになり、角膜分野においても、表皮に含まれる幹細胞 (毛包幹細胞) から角膜上皮様細胞への形質転換が可能であることが示されている (Gao, et al. *Sci China C Life Sci.* 2007. 50:101-10., Yang, et al. *Cell Biol Int.* 2009. 33:861-6., Blazejewska, et al. *Stem cells.* 2009. 27:642-52.). 我々もまた、表皮細胞を角膜上皮細胞に形質転換させ、臨床応用するため、マウスモデルを用いた研究を進めてきた。本研究では、Wnt 阻害因子 (sFRP2) が角膜上皮様細胞への分化誘導に關与する可能性を示唆する結果が得られた。一方で、輪部上皮における Wnt 関連因子の発現は報告されているものの、実質における発現はほとんど調べられていないのが現状である。種々の実質由来の液性因子 (サイトカイン) が paracrine に働き、角膜上皮細胞の恒常性維持に關与することはよく知られ、実質由来の Wnt 因子もまた同様に角膜上皮細胞の分化制御に關与していると考えられる。

角膜上皮細胞の分化誘導、恒常性の維持に上皮-実質間相互作用が重要な働きをしていると考えられており、角膜再生医療の分野においても、上皮細胞の分化制御機構における実質の働きを解明することは重要課題の一つである。我々は、ヒト線維芽細胞を I 型コラーゲンと混合して培養したコラーゲンゲル上で角膜上皮細胞を培養することで、正常角膜と類似した三次元培養角膜モデルを作製することに成功し、角膜上皮の重層化過程における液性因子を介した上皮-実質間の相互作用について研究を行い、この培養系における上皮-線維芽細胞間の相互作用が、上皮細胞の分化に必須であることを報告した (Kobayashi, et al. *Exp Eye Res.* 2015. 135:109-17.). また、この三次元培養モデルを応用し、ヒト角膜輪部線維芽細胞を含むコラーゲル上でマウス表皮 sp 細胞を培養することで K12 遺伝子の発現が認められることが明らかとなった。これらの成果は、形質転換および角膜上皮の分化誘導における分子機構の解明を促進するものと考えられ、表皮幹細胞を用いた角膜上皮再生医療、さらに、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 等を用いた次世代の再生医療の実現に貢献できると考えられる。

(4) 今後の展望

本研究の成果から、角膜輪部の Wnt シグナルが表皮由来細胞から角膜上皮様細胞への形質転換に關与する可能性が示唆された。しかしながら、Wnt シグナルの調節には同時に複数の因子が關与することも考えられ、これらの因子の組み合わせについても詳細な検討

が必要であると考えられた。一方で、ヒト角膜輪部線維芽細胞をI型コラーゲンと混合して培養したコラーゲンゲル上でマウス表皮sp細胞を培養する三次元培養モデルにおいてK12遺伝子の発現が認められることが明らかとなり、形質転換における上皮-実質間相互作用を検討する上で有用なツールであると考えられた。この技術を応用することで、今後、Wnt関連因子を始めとする輪部実質細胞由来因子が形質転換に及ぼす影響を詳細に検討することが可能である。

我々の最終目標は、重症角膜輪部機能不全症候群への臨床応用であり、Wntシグナル関連因子をはじめとする輪部実質由来因子の検討をさらに進め、上皮細胞の分化における働きの解明を目指す。これら輪部因子に関する知見は、細胞移植のみならず、失われた輪部機能を再生するための遺伝子治療または薬物治療の新たなターゲットとしても大いに期待できると考えられる。

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15件)

Shiraishi A, Zheng X, Sakane Y, Hara Y, Hayashi Y. In vivo confocal microscopic observations of eyes diagnosed with posterior corneal vesicles. *Jpn J Ophthalmol*. 2016 Nov;60(6):425-432. (査読有り)

Inoue T, Hara Y, Kobayashi T, Zheng X, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y. Corona sign: manifestation of peripheral corneal epithelial edema as a possible marker of the progression of corneal endothelial dysfunction. *Jpn J Ophthalmol*. 2016 Sep;60(5):349-56. (査読有り)

Yamaguchi M, Sakane Y, Kamao T, Zheng X, Goto T, Shiraishi A, Ohashi Y. Noninvasive Dry Eye Assessment Using High-Technology Ophthalmic Examination Devices. *Cornea*. 2016 Nov;35 Suppl 1:S38-S48. (査読有り)

Zheng X, Yamaguchi M, Kamao T, Sakane Y, Goto T, Shiraishi A, Ohashi Y. Visualization of Tear Clearance Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography and Polymethylmethacrylate Particles. *Cornea*. 2016 Nov;35 Suppl 1:S78-S82. (査読有り)

Shiraishi A, Zheng X, Sakane Y, Hara Y, Hayashi Y. In vivo confocal microscopic observations of eyes diagnosed with posterior corneal vesicles. *Jpn J Ophthalmol*. 2016 Nov;60(6):425-432 (査読有り)

Inoue T, Hara Y, Kobayashi T, Zheng X, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y.

Corona sign: manifestation of peripheral corneal epithelial edema as a possible marker of the progression of corneal endothelial dysfunction. *Jpn J Ophthalmol*. 2016 Sep;60(5):349-56. (査読有り)

Takemori N, Takemori A, Tanaka Y, Ishizaki J, Hasegawa H, Shiraishi A, Ohashi Y. High-throughput production of a stable isotope-labeled peptide library for targeted proteomics using a wheat germ cell-free synthesis system. *Mol Biosyst*. 2016 Jul 19;12(8):2389-93. (査読有り)

Yamamoto Y, Shiraishi A, Sakane Y, Ohta K, Yamaguchi M, Ohashi Y. Involvement of Eyelid Pressure in Lid-Wiper Epitheliopathy. *Curr Eye Res*. 2016;41(2):171-8. (査読有り)

Yamamoto Y, Yokoi N, Ogata M, Shiraishi A, Yamaguchi M, Uno T, Inagaki K, Hayashi K, Kinoshita S, Ohashi Y. Correlation Between Recurrent Subconjunctival Hemorrhages and Conjunctivochalasis by Clinical Profile and Successful Surgical Outcome. *Eye Contact Lens*. 2015 Nov;41(6):367-72. (査読有り)

Yoshioka E, Yamaguchi M, Shiraishi A, Kono T, Ohta K, Ohashi Y. Influence of Eyelid Pressure on Fluorescein Staining of Ocular Surface in Dry Eyes. *Am J Ophthalmol*. 2015

Oct;160(4):685-692.e1. (査読有り)

Kobayashi T, Shiraishi A, Hara Y, Kadota Y, Yang L, Inoue T, Shirakata Y, Ohashi Y. Stromal-epithelial interaction study: The effect of corneal epithelial cells on growth factor expression in stromal cells using organotypic culture model. *Exp Eye Res*. 2015 Jun;135:109-17. (査読有り)

Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y, Kandori M, Miyazaki D, Inoue Y, Soma T, Nishida K, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S; Japan Corneal Endotheliitis Study Group. Clinical features and management of cytomegalovirus corneal endotheliitis: analysis of 106 cases from the Japan corneal endotheliitis study. *Br J Ophthalmol*. 2015 Jan;99(1):54-8. (査読有り)

Inoue T, Kobayashi T, Nakao S, Hara Y, Suzuki T, Hayashi Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y. Horizontal

intracorneal swirling water migration indicative of corneal endothelial function. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Nov 20;55(12):8006-14. (査読有り)

Shiraishi A, Yamaguchi M, Ohashi Y. Prevalence of upper- and lower-lid-wiper epitheliopathy in contact lens wearers and non-wearers. Eye Contact Lens. 2014 Jul;40(4):220-4. (査読有り)
Yamaguchi M, Ohta K, Shiraishi A, Sakane Y, Zheng X, Kamao T, Yamamoto Y, Inoue Y, Ohashi Y. New method for viewing Krehbiel flow by polymethylmethacrylate particles suspended in fluorescein solution. Acta Ophthalmol. 2014 Dec;92(8):e676-80. (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

坂根由梨、原祐子、鄭曉東、林康人、鈴木崇、宇野敏彦、白石敦、大橋裕一
角膜移植眼における角膜感染症の検討
第41回日本角膜学会総会(アクロス福岡、福岡県福岡市)2017年2月16日-18日

小林剛、三谷亜里沙、林康人、高平尚子、白石敦、大橋裕一
誘導性不死化結膜上皮細胞と結膜線維芽細胞を用いた三次元結膜モデルの検討
第41回日本角膜学会総会(アクロス福岡、福岡県福岡市)2017年2月16日-18日

三谷亜里沙、小林剛、林康人、高平尚子、白石敦、大橋裕一
ドキンサイクリン誘導性SV40大型T抗原導入ヒト結膜上皮細胞の作製と評価
第41回日本角膜学会総会(アクロス福岡、福岡県福岡市)2017年2月16日-18日

小林剛、中尾早織、林康人、高平尚子、白石敦、大橋裕一
ドキンサイクリン誘導性SV40T抗原導入結膜上皮細胞におけるムチン遺伝子の発現
第120回日本眼科学会総会(仙台国際センター、宮城県仙台市)2016年4月7日(木)-10日(日)

小林剛、中尾早織、林康人、高平尚子、白石敦、大橋裕一
ドキンサイクリン誘導性SV40T抗原導入結膜上皮細胞の作製と評価
第40回日本角膜学会総会(軽井沢プリンスホテル ウエスト、長野県軽井沢市)2016年2月18日-20日

井上智之、小林剛、原祐子、鈴木崇、鄭曉東、林康人、白石敦、大橋裕一、大嶋佑介、今村健志

角膜内水平方向の水分移動：角膜内渦流
第39回日本角膜学会総会(高知市文化プラザかるぼーと、高知県高知市)2015年2月11日-13日

原祐子、坂根由梨、白石敦、宇野敏彦、

鈴木崇、鄭曉東、林康人、井上智之、山口昌彦、大橋裕一
愛媛大学における角膜移植の動向と治療成績
第39回日本角膜学会総会(高知市文化プラザかるぼーと、高知県高知市)2015年2月11日-13日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 敦 (Shiraishi, Atsushi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90314963

(2) 研究分担者

小林 剛 (Kobayashi, Tsuyoshi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教
研究者番号：70380285

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし