

平成30年 5月28日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09446

研究課題名(和文) 血清フェリチンによる鉄代謝調節因子ヘプシジン発現調節を介した生体鉄感知機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for iron sensing mechanism via the direct regulation of hepcidin expression by serum ferritin protein

研究代表者

生田 克哉 (IKUTA, KATSUYA)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00396376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、鉄過剰時に増加する血清フェリチンが、鉄代謝調節因子ヘプシジンの発現を調節する可能性の検討から生体鉄感知機構の解明を目指して行った。ヒト脾臓由来フェリチンにて肝癌細胞株 HepG2におけるHAMP遺伝子発現亢進を確認した。フェリチンの2つのsubunit個別の検討のため、各々の強制発現 HEK293細胞の培養上清や大腸菌で産生した蛋白を用いて検討したが、HAMPは逆に低下し、乖離した結果となった。これは生体内の状況に応じて双方向的なfineな調整を示唆する可能性があり、本研究で得られた成果を基礎とし含有鉄やheteropolymerの状態などを検討し、引き続き研究を継続させる予定である。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to determine the possibility that serum ferritin protein which increases in iron overload directly regulate iron regulatory peptide hepcidin produced from hepatocytes. Upregulation of HAMP (hepcidin) gene in human hepatoma-derived HepG2 cells was observed when cells were incubated with human spleen-derived ferritin protein. Because ferritin protein is present as heteropolymer of L- (FTL) and H- (FTH) subunit of ferritin, the influences of each subunit were then determined. The medium incubated with FTL- or FTH-overexpressed HEK293 cells, and FTL or FTH protein purified from transformed E. Coli were used; however, HAMP expression was decreased contrary. The results obtained from this study seemed to be discrepant, but there is a possibility that ferritin might manipulate HAMP expression quite finely utilizing bidirectional effect. This study will be further continued considering iron contents in ferritin, and the ratio of each subunit in heteropolymer.

研究分野：鉄代謝

キーワード：鉄代謝 フェリチン ヘプシジン 鉄感知機構

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は生体にとって必要不可欠な金属元素であるが、逆に過剰に存在すると様々な活性酸素種の生成が促進され生体に毒性を示す。そのため、生体にとって過剰となった鉄は、活性酸素種を容易に産生しないように隔離・格納されておく必要が生じる。全身の細胞内においてその鉄の格納を担う分子がフェリチンである。フェリチンは、高い相同性を有する H-(FTH)および L-subunit (FTL)の 2 種類の subunit が 24 個集合して heteropolymer を形成した分子であり、形態的には卵の殻状を呈し、鉄原子を格納できる。フェリチンは本来細胞内で鉄貯蔵を担う分子であるが、生体が鉄過剰に陥った際に細胞内で発現が亢進すると一部が細胞外に出現し、血清フェリチンという形で存在するようになる。この血清フェリチンは、体内の総鉄貯蔵量を良好に反映するマーカーとして古くから臨床検査として用いられているが、生理的機能の有無に関してはほとんど解析が進んでいなかった。しかし近年、血清フェリチンが単なる血中のマーカーではなく、各種細胞に鉄を運搬するという報告や、小腸でのフェリチン FTH 遺伝子 knockout マウスが鉄過剰に陥るといふ報告 (Vanoaica L. Cell Metab. 2010) が見られる。さらに、血清フェリチンの FTH が各種の細胞膜表面に発現しているトランスフェリン受容体 1 (transferrin receptor 1:TfR1)との結合を介し細胞内に取り込まれるとの報告もある (Li. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010)。

一方、生体内が鉄過剰に陥るのを抑制するのに重要な因子として、鉄代謝調節因子ヘプシジンがある。ヘプシジンは、生体が鉄過剰に陥った際に肝臓から産生されるペプチドホルモンで、消化管上皮細胞および網内系マクロファージの細胞膜表面に発現する ferroportin の分解を促進するように機能するため、最終的に消化管からの鉄の吸収および網内系からの鉄の再利用を抑制する。これは生体が鉄過剰状態になるのを防ぐためには極めて重要なシステムであるが、鉄過剰状態を生体がどのように感知してヘプシジンの産生を亢進させるのか不明な点が多い。ヘプシジンの発現調節機構には、当初予想されていたよりも複雑で多くの分子が関与していることが判明している。HFE、transferrin receptor 2 (TfR2) という蛋白は肝細胞に発現が高いが、これらに遺伝的に変異があるとヘプシジンの発現が低下し遺伝性鉄過剰症を呈することがわかっており、HFE は TfR1 と細胞膜表面で結合していることも知られている。さらに、TfR1 と TfR2 の間で HFE が移動することで細胞内にシグナルが伝わり鉄感知をしているという可能性も提唱されている。しかし、肝細胞には TfR1 の発現は低

く、さらに申請者はこれまで肝細胞における TfR2 に古くから着目し研究を進め TfR2 とトランスフェリン結合鉄 (diferric transferrin: Fe<sub>2</sub>-Tf) との結合は極めて弱いことを確認している (Ikuta K et al. Int J Biochem Cell Biol. 2004)。つまり、最も重要な命題である鉄代謝の状態変化そのものによるヘプシジン発現調節の直接的証拠は現在まで十分に示されておらず、大きな謎のままである。

## 2. 研究の目的

これらの事実を合わせ考え、鉄過剰状態では Fe<sub>2</sub>-Tf の変化ではなく、血中に増加したフェリチンを肝細胞が TfR1 を介して感知して、最終的に鉄代謝調節因子ヘプシジン発現を亢進させる可能性があるのではないかと着想するに至った。本研究で血清フェリチンを介したヘプシジン産生調節機構が明らかになれば、生体内鉄感知システムの解明、特に鉄過剰が病態増悪に関与する多くの疾患での血清フェリチンの生理的意義や病態への関与を解明し、さらにモニタリングの臨床的有用性の理解をも進展させると考え、本研究を開始した。また、ヘプシジン発現調節機構を modulate する薬剤開発における基礎的基盤を整え、各種疾患への有効な新規治療戦略への応用にも繋げるのも将来的目的である。

## 3. 研究の方法

(1) フェリチン蛋白製剤による肝癌細胞株での HAMP 発現変化の検討  
ウマフェリチン蛋白 (Sigma-Aldrich: F4503)、ヒトフェリチン蛋白 (human ferritin L-chain recombinant 蛋白: WHO international standard ferritin, human, recombinant: NIBSC code: 94/572)、ヒト肝臓由来フェリチン蛋白 (Sigma: human liver ferritin IV: F6754) およびヒト脾臓由来フェリチン蛋白 (Sigma: human spleen ferritin V: F6879) を 200-3,000 ng/mL の濃度で HepG2, Huh-7 および Hep3B 細胞培養上清に添加し、24-48 時間での HAMP 発現変化を 18s を対照として real-time PCR で検討した (HAMP: Hs00221783\_m1, 18s: eukaryotic 18S rRNA endogenous control: VIC@MGB probe: 4319413E)。

(2) フェリチン H および L-subunit 発現ベクターの構築  
遺伝子組み換え実験は、「血清フェリチンによる鉄代謝調節因子ヘプシジン発現調節を介した生体鉄感知機構の解明」(学内整理番号 15-08) として平成 27 年 (2015 年 6 月 25 日) に申請・受理されてから施行した。Human ferritin H-chain (FTH)は M11146.1 を、Human ferritin L-chain (FTL)は M11147.1 を参照し、各 cDNA を cloning し、最終的に pIRESpuro2

(Clontech)に挿入し塩基配列を確認した。

(3) HEK293 細胞へのフェリチン H および L 発現ベクターの遺伝子導入および安定細胞株の樹立

培養した Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞に対し、Lipofectamine 3000 を用いて、1Ag ①および 6D⑩をトランスフェクションし、puromycin 2.5 µg/ml で 2 週間 selection 後、cloning cylinder を用いて各 10 個の clone を培養し、RNA 抽出・real-time PCR にて FTL や FTH の発現を確認し (使用 probe: FTL: Hs.00830226\_gH, FTH: Hs.01694011\_s1)、さらに細胞 lysate の western blotting を行い (使用抗体: FTL: Santa Cruz D-9: 1/100 dilution, FTH: Santa Cruz B-12: 1/100 dilution)、最終的に HEK293-FTL および HEK293-FTH を選択した。これらの細胞の培養液を fresh medium に交換し 24 時間、48 時間置き western blotting を行い、培養上清中への FTL および FTH 発現を検討した。

(4) HEK293-FTH or FTL 細胞と肝癌細胞株の共培養、培養上清添加での HAMP 発現変化の検討

HEK293-FTL や FTH 細胞を 2 日間培養した培養液を採取し、HepG2 や Hep3B に添加し、これらの肝細胞での HAMP 発現への影響を real-time PCR で検討した。

(5) フェリチン蛋白とトランスフェリン受容体の分子間相互作用のコンピューター解析

FTL や FTH 蛋白と TfR1 の分子間相互作用を分子モデリングシミュレーション MOE: (molecular operating environment, Chemical Computing Group Inc.) で解析した。

(6) TfR1 発現肝細胞の樹立

HepG2 や Hpe3B 細胞に対して、以前の研究で作成済であった TfR1 強制発現ベクターを transfection した。Puromycin による selection 後 cloning し、western blotting (1<sup>st</sup> Ab: Abcam Antibody Transferrin Receptor 1 (13E4), 2<sup>nd</sup> Ab: anti-IgG-Ab (R&D)) で TfR1 発現を検討した。

(7) 大腸菌によるフェリチン H or L 蛋白の産生・精製

遺伝子組み換え実験は、「血清フェリチンによる鉄代謝調節因子ヘプシジン発現調節を介した生体鉄感知機構の解明」(学内整理番号 15-08) を修正・追加する形として平成 29 年 (2017 年 4 月 20 日) に申請・受理 (学内整理番号 15-08-2) されている。

FTL-expression vector for E.Coli: pET-22(+) (Novagen) に組み込むため、各々両端に制限酵素切断部位を挿入した形で primer を作製した。

FTLs1(EcoRI), FTLas1(Xho1) を primer として用いて、FTL-1Ag①を鋳型とし、KOD-FX で cDNA を増幅させ、pGEM-Teasy vector (Promega) に挿入した。その後、電気泳動しバンドから MagExtractor で回収した fragment に対し、rTaq, dATP を用いて T 付加した後、pGEM-Teasy (Promega) に T4-DNA ligase で挿入した。得られた plasmid を EcoRI および Xho1 で切断して、電気泳動し、ゲルを切り出し MagExtractor にて回収し、同様に EcoRI と Xho1 で cut して精製した pET-22b と T4-DNA-ligase で結合させた。DH5αQICK で 1 clone (FTL⑬) が得られたが、FTL に終末コドン TAA が挿入されており、このままでは His-tag が付加されないことに気づいた。そのため、FTLs(TAA to TAC) と FTLas (TAA to TAC) の 2 つの primer を作成し、KOD-FX および DpnI での mutagenesis を行い、最終的に FTL-TAC3 を完成させ、塩基配列の最終確認を行った。FTH-expression vector for E.Coli: FTH in pIRESpuro2 および pET-22b(+) を各々 EcoRI と NotI で digest し、電気泳動してバンドを切り出し、MagExtractor で精製し、T4-DNA ligase で接続した。DH5α で transformation を行い、得られたプラスミドから FTH②を選び、pET-22b(T7 long) primer sequence を確認したが、終末コドン TAA が挿入されてしまっていた。そのため、FTHs(TAA to TAC) と FTHas (TAA to TAC) の 2 つの primer を作成し、KOD-FX および DpnI での mutagenesis を行い FTH-TAC2 を完成させ、最終的に塩基配列の確認を行った。

大腸菌を用いた蛋白精製: これらの vector で KRX を transformation し、プラスミドを抽出し insert の有無を確認してから、LB 3 mL で 37°C 2 時間培養した bacteria を、150 mL で flask で 37°C で再び増殖させる。途中で OD600 をチェックし、0.60 付近で 20% Rhamnose 0.75 mL/flask, 100µM IPTG 1.5 mL/flask で加え、室温で一晩培養する。48 mL ずつの大腸菌液を遠心分離しペレットにし、xTractor buffer 20 mL で溶解し、室温で 30 分後 11000 rpm, 20 min 遠心し、His Gravitrap (GE Healthcare) を使い精製する。得られた elution buffer に PBS で overnight 透析をかけ (Shake skin dialysis tubing)、Viva spin 12 pack, 10 kDa MWCO を使い、10000 g, 5 min で遠心し、最終的に蛋白濃度を確認する。(0.4-0.5 µg/µL 程度)。得られた蛋白を western blotting (blocking: 3% skim milk, 1<sup>st</sup> Ab: Funakoshi A190-114A Anti-6-His Rabbit Poly 1/10000, 2<sup>nd</sup> Ab: R&D Anti-Rabbit Poly 1/2000) で確認する。

(8) 精製したフェリチン H or L 蛋白による肝癌細胞株での HAMP 発現変化の検討

精製した FTL(+His) および FTH(+His) を用い

て、6-well plate に散布した HepG2 および Hep3B 細胞 (80% confluent) に 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  で加え、24 時間培養後 QIAGEN RNA extraction mini kit にて RNA を抽出し、*HAMP* 発現を real-time PCR (*hamp*: Hs00221783 1/2 dilution, 18s: ThermoFisher Eukaryotic 18srRNA 1/10 dilution) 解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) フェリチン蛋白製剤による肝癌細胞株での *HAMP* 発現変化の検討

ウマフェリチンやヒトフェリチン蛋白 (L-chain recombinant) 添加では、HuH-7、HepG2 および Hep3B 細胞のいずれにおいても *HAMP* はむしろ低下した。しかし、ヒト肝臓および脾臓由来フェリチン蛋白添付での検討では、HepG2 および Hep3B 細胞にて 1.4~2 倍程度の *HAMP* 上昇が確認された。(図 1)

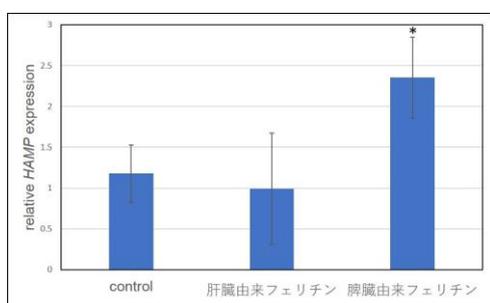


図 1. ヒト肝臓および脾臓由来フェリチン蛋白(500 ng/mL)による HepG2 および Hep3B 細胞における *HAMP* 発現変動

##### (2) フェリチン H および L-subunit 発現ベクターの構築

構築した FTL 発現 vector (1A-1)の塩基配列確認で position 146 の g の欠損が判明したため、mutagenesis で g を挿入し、1Ag①を完成させた(図 2A)。FTH では、構築した vector (6D⑩-1)は sequencing にて塩基配列および open reading frame であることを確認した(図 2B)。

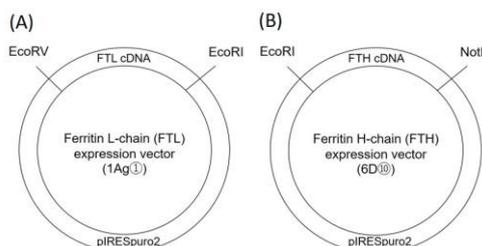


図 2. (A)FTL 発現ベクター、(B)FTH 発現ベクター (いずれも哺乳類細胞用)

##### (3) HEK293 細胞へのフェリチン H および L 発現ベクターの遺伝子導入および安定細胞株の樹立

HEK293 細胞に対する、1Ag①-1 および 6D⑩

-1 のトランスフェクションから最終的に HEK293-FTL-E および HEK293-FTH-C を選択した。これらの細胞から細胞外の培養上清へ FTL や FTH が放出されているかどうかの確認を行った。fresh medium に交換してから 24、48 時間での培養上清を sample として、western blotting を行ったところ培養上清中に FTL や FTH が検出された(図 3)。

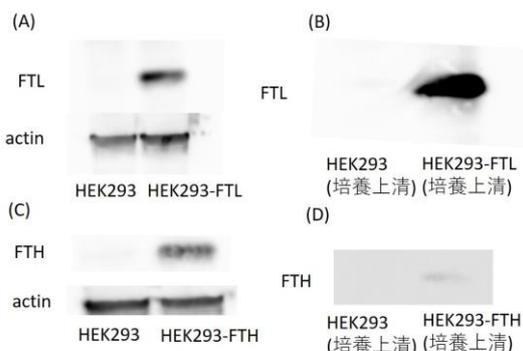


図 3. FTL 強制発現 HEK293 細胞での FTL 発現 (A: 細胞内、B: 培養上清)、FTH 強制発現 HEK293 細胞での FTH 発現 (C: 細胞内、D: 培養上清)

##### (4) HEK293-FTL or FTH 細胞と肝癌細胞株の共培養、培養上清添加での *HAMP* 発現変化の検討

実験間でバラツキが大きいですが、少なくとも HEK293 は HepG2 および Hep3B に働きかけ *HAMP* 発現を亢進させる何らかの生理活性物質を出していることを示す結果が得られた。ただ、その背景の上昇のため、FTL や FTH の効果は確認できなかった(図 4)。

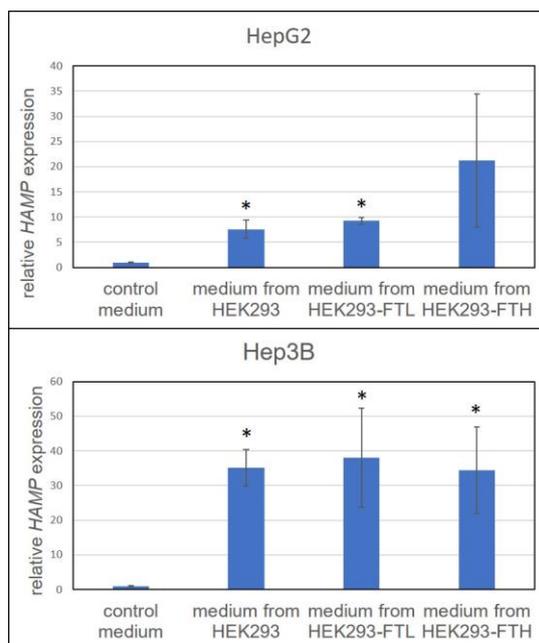


図 4. FTL および FTH 強制発現 HEK293 細胞培養上清での肝癌細胞株における *HAMP* 発現変化

(5) フェリチン蛋白とトランスフェリン受容体の分子間相互作用のコンピュータ解析

MOE による解析の結果では、FTL 蛋白はトランスフェリン受容体 1 dimer とは結合する要素は確認できなかったが、FTH 蛋白とは結合しやすい結果を得た (図 5)。

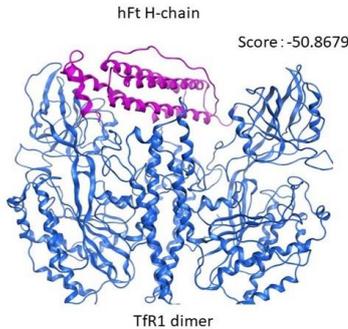


図 5. FTH と TfR1 の分子結合 simulation

(6) TfR1 発現肝細胞の樹立

HepG2 細胞に対し TfR1 発現ベクターを遺伝子導入し安定細胞株樹立を条件を変えながら複数回試みたが、puromycin で selection された clone のいずれも明確な TfR1 発現亢進を示さず、安定細胞株樹立はできなかった。HepG2 細胞への遺伝子導入効率の低さや gDNA への integration 効率の悪さ、cloning 後の増殖の悪さが影響していると考えられた。

(7) 大腸菌による FTL or FTH 蛋白の産生・精製

構築した FTL および FTH 発現 vector (図 6) を用いて大腸菌を transformation し、plasmid 抽出による確認を行い、transformation が確実なものを大量培養した。培養した大腸菌からの精製・透析後、western blotting での検討では、抗 His 抗体ではどちらも発現が確認され、且つ各特異抗体でも発現が確認され、検討に用いる十分な蛋白濃度も確認できた (0.4-0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  程度)。これにより、大腸菌による安定した蛋白作成手技が確立した (図 7)。

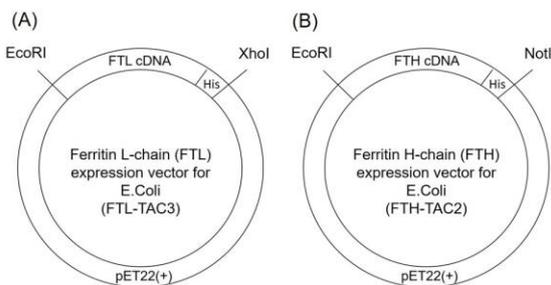


図 6. (A)FTL 発現ベクター、(B)FTH 発現ベクター (いずれも大腸菌用)

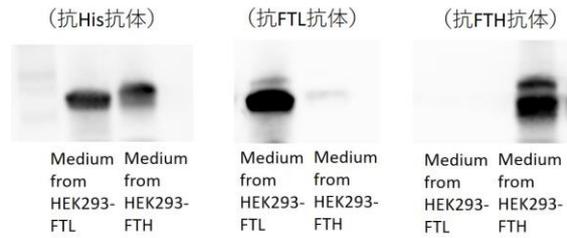


図 7. 大腸菌で産生・精製した FTL および FTH-His 蛋白のウエスタンでの確認

(8) 精製した FTH or FTL 蛋白による肝癌細胞株での HAMP 発現変化の検討

精製した FTL(+His)および FTH(+His)を用いて、6-well plate に散布した HepG2 および Hep3B 細胞 (80% confluent) に加え、24 時間培養後 QIAGEN RNA extraction mini kit にて RNA を抽出し、HAMP 発現を real-time PCR 解析した。FTH が HAMP 発現を亢進させる結果を得たが Hep3B 細胞では発現変化は認められなかった。しかし、その後も追試として同様の実験を複数回行ったが、当初認められた HepG2 細胞における FTH での HAMP 発現亢進作用は再現性をもって検出されなくなってしまった。細胞培養を 12-well で行い、quadruplicate など、設定を変えた検討も継続したが、同様の状態が続いている。

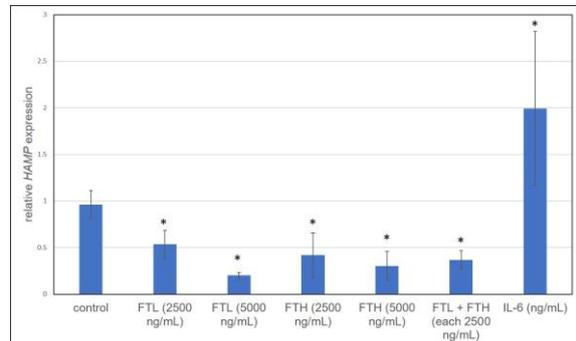


図 8. FTL および FTH 蛋白添加による HepG2 細胞における HAMP 発現変動 (\*IL-6 は positive control として使用)

【まとめ】 本研究では、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞において、臓器から精製されたフェリチン蛋白では HAMP 発現を亢進させる作用が確認された。しかし、各 subunit 毎の個別の検討では、むしろ HAMP 発現が低下する結果が得られ、実験間での結果の乖離が認められた。実際の生体では①血清中フェリチンは FTL と FTH の heteropolymer を形成していることや、②内部の鉄の含有量が影響し、これらによる fine な調整が行われている可能性が考えられる。本研究で培養細胞や大腸菌でのフェリチン蛋白精製などの安定した手技が確立できており、これらを利用して①②の影響を個別に検討していくため、特に FTL

および FTH 精製蛋白を使用した heteropolymer 形成や内部の鉄の含有状況の変化を含めて、研究をさらに推進させたいと考えている。

#### 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 12 件) うち査読付論文 9 件

- ① 生田克哉、鉄代謝異常の病態と臨床検査。日本検査血液学会雑誌、査読無、第 18 巻第 3 号、2017、448-456.
- ② Ikuta K, Hatayama M, Addo L, Toki Y, et al. (20 人中生田 1 番目、土岐 4 番目) . Iron overload patients with unknown etiology from national survey in Japan. 査読有 2017; 105(3): 353-360. doi: 10.1007/s12185-016-2141-9.
- ③ Yamamoto M, Tanaka H, Toki Y, Hatayama M, Ito S, Addo L, Shindo M, Sasaki K, Ikuta K, et al (13 人中生田 9 番目、土岐 3 番目、伊藤 5 番目、進藤 7 番目) . Iron-induced epigenetic abnormalities of mouse bone marrow through aberrant activation of aconitase and isocitrate dehydrogenase. Int J Hematol. 査読有. 2016; 104(4): 491-501. doi: 10.1007/s12185-016-2054-7.
- ④ Toki Y, Sasaki K, Tanaka H, Yamamoto M, Hatayama M, Ito S, Ikuta K, Shindo M, et al (15 人中生田 7 番目、土岐 1 番目、伊藤 6 番目、進藤 8 番目) . A selective splicing variant of *hepcidin* mRNA in hepatocellular carcinoma cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 査読有. 2016; 476(4): 501-507. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.153.
- ⑤ Addo L, Ikuta K, Tanaka H, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Ito S, Shindo M, et al (12 人中生田 2 番目、土岐 4 番目、伊藤 7 番目、進藤 8 番目) . The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). Int J Hematol. 査読有. 2016; 103(1): 34-43. doi: 10.1007/s12185-015-1885-y
- ⑥ 洪佐琴恵、畑山真弓、土岐康通、山本昌代、伊藤 巧、進藤基博、藤谷幹浩、新関紀康、友田 豊、河合優一、Addo Lynda、生田克哉 (12 人中生田 12 番目、土岐 3 番目、伊藤 5 番目、進藤 6 番目) イムノクロマト迅速定量測定試薬「ポイントストリップフェリチン-3000」の基礎評価。臨床病理。査読有、第 63 巻第 12 号、2015、1371-1376.
- ⑦ Ito S, Ikuta K, Kato D, Addo L, Shibusa K, Niizeki N, Toki Y, Hatayama M, Yamamoto M, Shindo M, et al (13 人中生田 2 番目、伊藤 1 番目、土岐 7 番目、進藤 10 番目) . In

vivo behavior of NTBI revealed by automated quantification system. Int J Hematol. 査読有. 104(2):175-81. doi:

10.1007/s12185-016-2002-6. 他、計 12 件

[学会発表] (計 19 件)

- ① Yamamoto M, Tanaka H, Ishioh M, Saito T, Toki Y, Hatayama M, Shindo M, Ikuta k, et al. Suppression of erythropoiesis in the mouse model mimicking repeated-transfusion induced iron overload. Seventh Congress of the International BioIron Society (IBIS) Biennial World Meeting、査読有、in Los Angels, USA (May 8<sup>th</sup>, 2017).
- ② 生田克哉、鉄代謝異常の病態と臨床検査。第 18 回日本検査血液学会学術集会・教育講演、査読無、2017 年 7 月 22 日(土)、札幌
- ③ Hatayama M, Ikuta K, Yamamoto M, Toki Y, Shindo M, et al. Development a novel reagent measuring redox activity of iron overload using an automated analyzer. 第 79 回日本血液学会学術集会、査読有、2017 年 10 月 21 日、東京
- ④ 坂尻徹也、生田克哉、山村堯樹。トランスフェリン受容体 2 における鉄トランスフェリンとの間の生体鉄センサーに関わるキー残基の探索。第 40 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、査読有、2016 年 9 月 11 日、名古屋、他、計 19 件

[図書] (計 16 件)

- ① 生田克哉、鉄代謝異常(鉄欠乏・鉄過剰)の評価およびモニタリング。SRL 宝函、第 37 巻第 3 号、P4-12, 株式会社 SRL、2016、他、計 16 件

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

生田 克哉 (IKUTA, Katsuya)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00396376

##### (2)分担研究者

進藤 基博 (SHINDO, Motohiro)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10396377

伊藤 巧 (ITO, Satoshi)  
旭川医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：80548686

(異動により削除：平成 28 年 3 月 17 日)

土岐 康通 (TOKI, Yasumichi)  
旭川医科大学病院・医員  
研究者番号：90596280