

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：35412

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15206

研究課題名(和文) 難治性疼痛の発症と維持機構におけるmiRNA/TLR系の役割, 新規治療戦略の開拓

研究課題名(英文) Extracellular miRNA causes neuropathic pain via spinal TLR7 in peripheral nerve injury.

研究代表者

森田 克也 (Morita, Kastuya)

広島文化学園大学・看護学部・教授

研究者番号：10116684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：最近, miRNAのLet-7bがDRGから遊離され, Let-7b-5p末梢投与はTLR7を介して急性痛を惹起すること, Let-7b-5pはTLR7に作用してミクログリアやアストロサイトを活性化することが明らかとなった。神経障害により遊離されたLet-7b-5pが疼痛の発現に関係する可能性を検討した。Let-7b-5pの脊髄腔内投与によりアロディニアを誘発し, 脊髄TLR7ノックダウンで消失した。神経障害性疼痛モデルでLet-7b阻害薬, 脊髄TLR7ノックダウンでアロディニアは消失した。末梢神経障害により脊髄に遊離したmiRNAがTLR7を介して神経障害性疼痛の発現に関係することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that let-7b (miRNA lethal-7b) can be released from DRG neuron and intraplantar injection of let-7b-5p elicits rapid spontaneous pain via TLR7 and let-7b-5p can activate microglia and astrocytes via activation of TLR7. In the present study, we focused on the possible role of let-7b-5p, abundant in neuron, released into spinal cord by peripheral neuronal damage and contribute to the development of neuropathic pain via activation of spinal microglia and astrocytes. Intrathecal application of let-7b-5p and TLR7 agonists elicited severe and long lasting allodynia. The allodynia response to let-7b-5p and TLR7 agonists was abolished by intrathecal injection of siRNA of TLR7 mRNA. Allodynia response in neuropathic pain models by peripheral nerve injury was abolished by let-7b-5p against and the knockdown of spinal TLR7. The present results suggest that miRNA secreted in spinal cord by peripheral nerve injury participate in the development of neuropathic pain via TLR7.

研究分野：薬理学

キーワード：マイクロRNA Let-7b-5p TLR7 鎮痛 神経障害性疼痛 難治性疼痛

1. 研究開始当初の背景

繰り返される疼痛刺激や神経損傷、脊髄の損傷時には痛覚の感作、即ち、痛覚過敏やアロディニアといった異常疼痛が生じる。アロディニアは本来痛みを伝えない軽いタッチなどの触覚や冷覚といった非侵害性刺激によっても激しい痛みを生じる現象であり、神経障害性疼痛の主症状として知られている。これらは非常に長期間持続し、難治性で従来の非ステロイド性鎮痛薬や麻薬性鎮痛薬が奏効しないのも特徴であり、患者の日常生活を障害し QOL を著しく低下させる。新しい治療法・治療薬の開発が待たれている。

アロディニアや痛覚過敏の発症メカニズムについては、一次知覚神経末梢の侵害受容器の興奮性増大と、脊髄における感作、神経の再構築など構造上の変化、さらに、抑制性神経の脱抑制などが提唱されているが、その詳細は不明である。近年、シナプス伝達にアストロサイトやミクログリアを加えた、いわゆる tripartite synapse という概念 (Araque et al., 1999) が導入され、モデル動物における神経障害性疼痛の成立と維持に活性化アストロサイトやミクログリア、さらには末梢白血球の浸潤により産生される炎症関連因子の関与が重要であるとの認識が深まってきている (Milligan et al., 2001)。しかしながら、神経障害からミクログリア・アストロサイトの活性化に至る機序は明らかになっていない。この様な状況の中、中枢神経系に多く見出される分泌型マイクロ RNA (miRNA) の Let-7b が損傷を受けた神経細胞から産生・遊離され、遊離された細胞外 let-7b が Toll 様受容体 7 (TLR7) を活性化し、皮質および海馬のニューロンのアポトーシスや神経障害の増悪を引き起こすことが報告された (Lehmann et al., *Nat Neurosci* 15(6):827-835, 2012)。加えて、TLR7 は脊髄でミクログリアやアストロサイト、脊髄後根神経細胞 (DRG) にも発現しており、TLR7 の活性化がミクログリアやアストロサイトを活性化し種々の炎症性サイトカインなどを分泌することが知られている (Nicotra et al., *Exp Neurol* 234(2):316-329, 2012)。

2. 研究の目的

私達はこれまで、血小板活性化因子 (PAF) の生理・病態生理に関する研究を長年行ってきた。中でも、脊髄腔内に投与した極めて微量の PAF が神経障害性疼痛の指標である痛覚過敏とアロディニアを誘発することを明らかにした。申請者らは難治性疼痛の発症と維持機構に関する一連の研究より、神経障害や慢性炎症により、ミクログリアやアストロサイトの活性化に基づく PAF の持続的産生・遊離が疼痛の発症と維持に深く関わっていること、PAF は脊髄で抑制性グリシン神経伝達を阻害することにより疼痛を惹起すること、更に神経障害性疼痛をはじめ、がん性疼痛や慢性炎症性疼痛等の難治性疼痛モデルに於いて PAF 阻害薬は極めて強力で、長時間持続性の鎮痛効果を発揮すること等を報告してきた (Morita et al., *Pain* 111:351-9, 2004; *Pain* 138:525-36, 2008; *PLoS One* 9(3):e91746, 2014; Motoyama et al., *Eur J Pain* 17(8):1156-67, 2013)。しかし、これらグリア細胞が神経障害や疼痛刺激により活性化される機構については不明で

あった。

本研究は miRNA の新しい機能に焦点を当て、Let-7b-5p の痛覚刺激伝達における役割について、1) Let-7b-5p による痛覚過敏やアロディニア誘発とその機序、2) 各種神経因障害性疼痛モデルや炎症性疼痛モデルにおける Let-7b-5p の関与、Let-7b-5p が関連する機能分子をターゲットとした新規鎮痛薬の開発について検索した。

3. 研究の方法

試験薬物: 細胞外 Let-7b-5p の疼痛に対する関与を検討するために、Let-7b-5p, Let-7b-5p against, Let-7c-5p, miR599a-5p, miR124, TLR7 認識モチーフ (5'-GUUGUGU-3') の合成オリゴデオキシヌクレオチド (ODNs) を使用した。全ての合成 ODNs は安定化のためにリン酸基を phosphotriate 化 (S 化) して使用した。合成は Bonac Corporation (Kurume, Japan) に依頼した。TRPA1 阻害薬 HC030031, TLR7 ligands (resiquimod, loxoribine), アストロサイト阻害薬 L- α -amino adipate (LAA), Complete Freund's adjuvant (CFA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) を使用した。PAF 受容体阻害薬 TCV-309 は武田薬品工業 (京都) より譲渡頂いた。

薬物の投与方法: Resiquimod および HC030031 は DMSO に溶解後、人工脳脊髄液 (ACSF) または生理食塩水で希釈 (最終 DMSO 濃度 0.1% 以下) した。他の試薬は ACSF または生理食塩水に溶解した。薬物は静脈内投与 (i.v. 投与) あるいは脊髄くも膜下腔内投与 (i.t. 投与) した。i.t. 投与はマウスの第 5、第 6 腰椎間から薬物 5 μ l をゆっくり投与した。

実験動物: 実験には生後 5 週齢、25~30 g の ddY 系雄性マウスを用いた。動物の取り扱いは全て日本薬理学会動物取り扱いガイドラインおよび広島大学動物取り扱いガイドラインに準拠して行った。

実験的疼痛モデルの作成

各種神経因性疼痛モデルマウス (坐骨神経部分結紮モデル, Streptozotocin (STZ) 誘発痛性糖尿病性ニューロパチーモデル, Complete Freund's adjuvant (CFA) 誘発慢性炎症性疼痛モデル) を作成し、抗侵害作用は薬物を脊髄腔内投与または静脈内投与した時のアロディニアスコアとアロディニア閾値の変化から評価した。熱痛覚過敏反応はホットプレートテストにより評価し、鎮痛作用はホルマリンテストにより評価した。

アロディニアスコア: ペイントブラシで軽く患部を撫でる触覚刺激に対する逃避行動の程度をスコア化して評価した。即ち、0: 反応なし、1: 軽く鳴く、筆から逃れようとする、2: 激しく鳴く、筆に噛付こうとする、筆から激しく逃れようとする、を基準とした。

アロディニア閾値: von Frey hairs フィラメントによる患肢足蹠刺激に対する後足の逃避行動閾値より評価した。刺激強度はグラムで表した。

評価は薬物投与の前、及び投与後の特定の時点で実施した。研究は観察者に処置群を判別できない環境下でおこなった。

坐骨神経部分結紮モデルマウス: マウスを isoflurane (4% in air) 麻酔下に坐骨神経を剖出し、8-0 絹糸を用いて坐骨神経の 1/2~1/3 をきつく結紮し、皮膚を縫合した。Sham マウスは坐骨神経

を露出するのみで、結紮することなく皮膚を縫合した。坐骨神経部分結紮 0.5 日後にはすでにアロディニアスコアの上昇とアロディニア閾値の低下を認め、90 日以上一定に推移した。全ての実験においてマウスは 1 回の実験にのみ使用した。

STZ 誘発糖尿病性ニューロパチーモデル: STZ (200 mg/kg) を 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.1) に溶解して、マウス尾静脈から i.v. 投与した。血液中のグルコース濃度が 400 mg/dl 以上を糖尿病モデルマウスとして使用した。アロディニアは STZ 投与 3 日後から顕著にみられ、50 日以上経過しても強いアロディニア応答がみられた。同一週齢対照群として、citrate buffer のみを投与してもマウスに疼痛は発症しなかった。

CFA 誘発慢性炎症性疼痛モデル: マウスを軽いエーテル麻酔下に、20 μ l の CFA を右足蹠へ皮下投与することにより形成した。対照群にはミネラルオイルを皮下投与した。

Hot-plate test: マウスを 52.5 $^{\circ}$ C に保たれた熱板上に置き、逃避行動 (足をなめる licking, 立ち上がる rearing, ジャンプする jumping) までの潜伏時から評価した。

Planter test: プランターテストでは、マウスの足底に赤外線熱刺激を与え、足をはねのける等逃避行動を起すまでの時間を測定することにより熱刺激痛覚過敏を評価した。

Tail immersion test: マウスの尾を 48 $^{\circ}$ C の温水中につけ、尾が逃避行動するまでの逃避反射潜伏時から評価した。

ホルマリンテスト: 1.5% のホルマリン溶液 25 μ l をマウスの後肢足蹠に皮下投与し、自発痛によって生じる疼痛関連行動 (licking, flinching, lifting, biting, guarding および shaking) の回数を 5 分間隔で 30 分間測定し評価した。

RNA 干渉による脊髄標的遺伝子ノックダウンマウスの作成: RNA 干渉により脊髄 TLR7 および LPCAT2 をノックダウンするため、TLR7-siRNA および LPCAT2-siRNA を調整し、i.t. 投与した。

siRNA の設計と脊髄 CD38 ノックダウンマウスの作成: RNA 干渉はこの目的のため、標的遺伝子の特異配列から 3 種類の siRNA (siRNA#1, siRNA#2, siRNA#3) を作成した。siRNA の非選択的な作用を調べるため 3 塩基の変異を導入した non-targeting siRNA (siRNA#4) を作成した。In vivo での siRNA 導入は Hemagglutinating virus of Japan envelope vector system (HVJ-Envelope Vector Kit GenomeONE; Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Osaka, Japan) を使用し、HVJ-Envelope Vector に封入後 RNAase-free-ACSF で siRNA (0.45 pmole/10 μ l) を i.t. 投与した。対照群は、同一量の non-targeting siRNA および HVJ-Envelope Vector のみを投与した。siRNA の合成は Bonac Corporation に依頼した。

脊髄ミクログリアおよびアストロサイトの単離培養: 生後 0-1 日のマウス新生仔脊髄を摘出し、実態顕微鏡観察下で髄膜、血管を剥離後ミンスし、0.25% Trypsin-EDTA で振盪することで調整したグリア細胞を polyethylenimine でコーティングしたフラスコに penicillin/streptomycin/fungizon, 20% FCS を含む DMEM 培地で混合培養した。培養 9-16 日目のフラスコよりアストロサイトの細胞層上にある

ミクログリアを分離した。その後、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ のインキュベーター内で 1 時間静置し、ミクログリア細胞を接着させ各実験に用いた。アストロサイトは神経細胞やミクログリアを除去する目的で、継代培養 (3 代) を行った。培養後アストロサイトは non-coated plates に播種し 48 時間インキュベーション後実験に供した。

培養細胞の処置: 培養ミクログリアやアストロサイトは Let-7b-5p (60 μ g/ml), Ixoribine (1 mM), ATP (100 μ M), LPS (100 ng/ml), PAF (0.4 nM) と 3-6 時間インキュベーションした後 HBSS で 2 回洗浄後、Ca²⁺-free HBSS で 5 分間インキュベーションすることで細胞を回収し、マウス脊髄腔内に移植した。別の実験では、薬物とインキュベーション後、細胞を洗浄した後新しい培養液に交換してさらに 12 時間インキュベーションした。培養上清を分取し i.t. 投与した。

4. 研究成果

1) Let-7b-5p の侵害作用

分泌型 miRNA で脳に多く存在する Let-7b-5p の脊髄腔内投与により 5 日前後持続するアロディニアおよび熱刺激痛覚過敏を誘発することを見出した。Let-7b-5p 誘発アロディニアや痛覚過敏は Let-7b-5p against (相補的 Let-7b-5p) 前処置により著明に抑制された。さらに、Let-7b-5p against による抑制はすでに形成されたアロディニアや痛覚過敏に対しても有効であり、Let-7b-5p はアロディニアの形成および維持機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) Let-7b-5p 誘発アロディニア・痛覚過敏に対する TLR7 の関与

Let-7b-5p 誘発アロディニアや痛覚過敏は脊髄 TLR7 ノックダウンにより消失した。加えて、TLR7 リガンド (resiquimod, Ixoribine) の i.t. 投与でアロディニアや痛覚過敏を惹起することを認められた。さらに TLR7 認識モチーフ (5'-GUUGUGU-3') の合成 ODN およびそのシークエンス中に認識モチーフを持つ miR599a-5p の i.t. 投与によってもアロディニアが生じたが、認識モチーフをもたない miR124 や認識モチーフの一塩基のみが Let-7b-5p と異なる Let-7c-5p ではアロディニアは生じなかった。従って Let-7b-5p は TLR7 を認識して、これを活性化しアロディニアや痛覚過敏を惹起することが示唆された。

3) Let-7b-5p 誘発アロディニアにおけるミクログリア・アストロサイトの関与

Let-7b-5p 誘発アロディニアはミクログリア阻害薬ミノサイクリン前処置およびアストロサイト阻害薬 LAA により抑制をみると、Let-7b がミクログリアおよびアストロサイトの TLR7 に作用し、これらグリア細胞を活性化する可能性が示唆された。更に、Let-7b-5p および Ixoribine とインキュベーションしたミクログリア、アストロサイトを脊髄に移植しても強いアロディニアが出現した。Let-7b-5p, Ixoribine を洗浄後、更に 12 時間培養した培養上清の i.t. 投与によってもアロディニアを認めた。Vehicle で培養したグリア細胞を移植してもアロディニアは認めなかった。培養ミクログリアおよびアストロサイトを PAF, ATP, LPS で刺激しても、移植ある

いは培養上清の i.t.投与によりアロディニアの発症を認めた。これら疼痛反応は PAF 阻害薬および誘導型 PAF 合成酵素 LPCAT2 をノックダウンにより著明な抑制を認めた。以上の知見より、Let-7b-5p は TLR7 の活性化を介してミクログリアやアストロサイト活性化し、PAF を産生・遊離してアロディニアや痛覚過敏の発症と維持(難治化)に寄与することが明らかとなった。

Park ら(*Neuron* 82(1): 47-54, 2014) は Let-7b-5p の末梢組織への皮下投与により TLR7 の活性化が、後根神経節感覚神経のカチオンチャネル TRPA1 を刺激し、疼痛反応を誘発することを報告している。しかし、Let-7b-5p i.t.投与によるアロディニアの誘発は末梢組織投与に比べ 1/10 以下の量で有効であり、更に TRPA1 阻害薬 HC3030 (1 nmol) i.t.投与による抑制は僅かであった。脊髄レベルでは末梢組織とは異なったメカニズムで疼痛を引き起こしている可能性が示唆された。

4) 病態生理学的疼痛における Let-7b-5p の関与

Let-7b-5p が脊髄でアロディニアや痛覚過敏を惹起することが明らかになった。そこで各種病態生理学的疼痛の発症と維持における Let-7b-5p の役割 および Let-7b-5p 関連物質の新規治療薬としての可能性について神経障害性疼痛モデルおよび炎症性疼痛モデルを用いて検討した。

Let-7b-5p against の i.t.投与は神経障害性疼痛モデル(坐骨神経部分結紮モデル、糖尿病性ニューロパチーモデル、CFA 誘発慢性炎症モデル)において強力な抗アロディニア作用、抗痛覚過敏作用を示した。炎症性疼痛モデル(ホルマリンテスト)においても強い鎮痛作用を認めた。Let-7b-5p が病態生理学的疼痛の発症と維持において重要な役割を演じていることを明らかにした。加えて、against はアロディニアの発症前、発症直後、維持期に投与しても同様の抗アロディニア作用を示し、疼痛の発現から維持に至るすべての過程で Let-7b-5p の産生が維持されていることが示唆される。実際、DRG 神経の脱分極刺激で Let-7b-5p が産生されることが報告されており(Park et al., *Neuron* 82(1): 47-54, 2014)、神経障害性疼痛や慢性炎症性疼痛を含む難治性疼痛で、一次知覚神経が慢性的に刺激され続けるような状態、或いは一時的にでも強い刺激が加わるような状態では Let-7b-5p の産生が維持されえる可能性が考えられる。

脊髄 TLR7 ノックダウン、および誘導型 PAF 合成酵素 LPCAT2 ノックダウン、PAF 受容体阻害薬全身投与により強い抗アロディニア、鎮痛作用を認めた。特に PAF 阻害薬 TCV-309 の連続頻回投与および脊髄 TLR7、LPCAT2 ノックダウンによりアロディニア応答が観察期間を通して(90 日以上)消失した。PAF は PAF 受容体に作用して PAF を産生・遊離する positive feedback loop が存在することが知られている。実際、私達も難治性疼痛病態時に LPCAT2 が発現誘導されており、疼痛の全ての過程で PAF が関係するとの知見を得ている(Morita et al., *PLoS One*. 9(3): e91746, 2014) 上記処置により PAF の positive feedback loop を断ち切ることで長期間にわたる疼痛の消失がもたらされたものと考えられる。

以上の知見から、病態時脊髄で Let-7b-5p 持続的産生 → TLR7 活性化 → ミクログリア・アストロサイト活性化 → 持続した PAF 産生・遊離(LPCAT2 の誘導) → 疼痛の発症と維持(難治化)というカスケードが考えられる。このことは、Let-7b-5p およびその下流に位置する機能分子が新しい神経障害性疼痛等の難治性疼痛の治療法、治療薬の開発のターゲット分子になる可能性を示している。Let-7b-5p 阻害薬、TLR7 阻害薬、LPCAT2 阻害薬の開発が待たれるところである。

本研究では種々の病態生理学的疼痛発症時における脳脊髄腔液中に Let-7b-5p 濃度が上昇している事実を示す事が必須である。現在その実証に向けて研究を推進しており、成果がまとまり次第報告書に纏め報告する。

なお、本テーマは今後更なる発展性を有しているので継続して研究を推進していく所存である。

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 5 件)

1. Hayashiuchi M, Kitayama T, Morita K, Yamawaki Y, Oue K, Yoshinaka T, Asano S, Harada K, Kang Y, Hirata M, Irifune M, Okada M and Kanematsu T. General anesthetic actions on GABA_A receptors *in vivo* are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice. *J Anesth*. 2017. (査読有) doi:10.1007/s00540-017-2350-2

2. Okada K, Okada M, Kamada N, Yamaguchi Y, Kakehashi M, Sasaki H, Katoh S and Morita K. Reduction of diuretics and analysis of water and muscle volumes. *Geriatr Gerontol Int*, 17(2):262-269, 2017. (査読有) doi:10.1111/ggi.12719

3. 土肥敏博, 森田克也 看護師さんも知っておきたい話題のくすり —新しい糖尿病治療薬, SGLT2 阻害薬 - **看護学統合研究** 18(2):55- 59, 2017. (査読有)

4. Kitayama T, Morita K, Motoyama N and Dohi T. Down-regulation of zinc transporter 1 in astrocytes induces neuropathic pain via the BDNF-KCC2 signaling pathway in the mouse spinal cord. *Neurochem. Int.*, 101:120-131, 2016. (査読有) doi:10.1016/j.neuint.2016.11.001

5. Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Shiraishi S and Dohi T. Pain relieving effect of platelet-activating factor (PAF) antagonists in a bone cancer pain model. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 146(2):87-92, 2015. (査読有) doi:10.1254/fjp.146.87

(学会発表)(計 8 件)

1. 森田克也, 本山直世, 土肥敏博 神経障害性疼痛の発症における脊髄 miRNA/TLR7 系の役割 Extracellular miRNA causes neuropathic pain via spinal TLR7 in peripheral nerve injury. 第 90 回日本薬理学会年会(長崎)2017.03

2. Motoyama N, Morita K, Shiba H and Dohi T. Anti-allodynic effect of knockdown of spinal LPCAT2, an inducible PAF synthesis enzyme in neuropathic pain

models in mice. 48th Annual Meeting of the Hiroshima University Dental Society, (Hiroshima)

3. 本山直世, 森田克也, 土肥敏博 血小板活性化因子(PAF)合成酵素 LPCAT2 の難治性疼痛における役割 第 36 回 日本歯科薬物療法学会学術大会(新潟) 2016.6

4. Dohi T, Morita K, Motoyama N and Shiraishi S. グリシントランスポーターを標的とした疼痛治療 Glycine transporters as novel targets in pain therapy. 第 89 回日本薬理学会年會(横浜) 2016.3

5. Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Kanematsu T and Dohi T. 神経障害性疼痛の発症と維持機構における誘導型血小板活性化因子(PAF)合成酵素 LPCAT2 の役割 Role of spinal LPCAT2, an inducible PAF synthesis enzyme on development and maintenance of painful peripheral neuropathy models in mice 第 89 回日本薬理学会年會(横浜)2016.3

6. 北山友也, 森田克也, 兼松 隆 細胞内亜鉛濃度変化に伴う神経障害性疼痛発症機序 第128回日本薬理学会近畿部会(大阪) 2015.11

7. Dohi T, Morita K, Motoyama N and Shiraishi S. Glycine transporter inhibitors relieve bone cancer pain. The 58th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry- Material brain, the harmony of molecules, Late-breaking Abstracts, 2015.(査読あり) 2015.6

8. 本山直世, 森田克也, 北山友也, 柴 秀樹, 土肥敏博 難治性疼痛の発症と維持における血小板活性化因子(PAF)合成酵素 LPCAT2 の役割 Role of the novel Platelet-Activating factor (PAF) synthetase LPCAT2 on chronic pain in mouse models. 第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会(北九州) Program and Abstracts, 2499. 2015.6

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○取得状況(計 1 件)

名称: 癌性疼痛を処理するための組成物およびその利用

発明者: 森田克也, 土肥敏博, 本山直世, 北山友也, 兼松 隆, 白石成二

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許権設定登録

番号: 第 5954790 号

取得年月日: 2016.06.24

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 克也 (MORITA KATSUYA)

広島文化学園大学・看護学部・教授

研究者番号: 10116684

(2)研究分担者

本山 直世 (MOTOYAMA NAOYO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 70509661

北山 友也 (KITAYAMA TOMOYA)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号: 60363082

土肥 敏博 (DOHI TOSHIHIRO)

広島文化学園大学・看護学部・教授

研究者番号: 00034182

(3)連携研究者

(4)研究協力者

讃井 真理 (SANAI MARI)

広島文化学園大学・看護学部・教授

研究者番号: 20412330

橋本 翠 (HASHIMOTO MIDORI)

広島文化学園大学・看護学部・准教授

研究者番号: 60735257

山田 晃子 (YAMADA AKIKO)

広島文化学園大学・看護学部・講師

研究者番号: 20738174

上林 聡子 (UEBAYASHI SATOKO)

広島文化学園大学・看護学部・助教

研究者番号: 90633165

大坪 かなえ (OTSUBO KANAE)

広島文化学園大学・看護学部・非常勤講師

研究者番号: 00461319

土井 彰子 (TSUCHII AKIKO)

広島文化学園大学・看護学部・学部学生

湊 真紀 (MINATO MAKI)

広島文化学園大学・看護学部・学部学生

浄土 由衣 (JODO YUI)

広島文化学園大学・看護学部・学部学生

志垣 万祐 (SHIGAKI MAYU)

広島文化学園大学・看護学部・学部学生

重元 美緒 (SHIGEMOTO MIO)

広島文化学園大学・看護学部・学部学生

柿木 康正 (KAKIMOTO YASUMASA)

広島文化学園大学・看護学部・学部学生