

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591300

研究課題名 (和文)

G タンパク質共役型受容体制御による新しいメラノーマ免疫治療法の開発

研究課題名 (英文)

Development of G Protein-Coupled Receptor-Mediated Melanoma Immunotherapy

研究代表者

瀬尾 尚宏 (SEO NAOHIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283354

## 研究成果の概要：

制御性T (regulatory T; Treg) 細胞は自己免疫、がん免疫、感染免疫、移植免疫、さらにはアレルギー免疫など、あらゆる免疫応答の調節に関与する。皮膚免疫領域においても、アトピー性皮膚炎や自己免疫性脱毛症や接触皮膚炎など、皮膚炎症を伴う薬疹の発症など皮膚免疫アンバランスに大きく関与することが解明されつつあり、皮膚疾患を含めた免疫性疾患の治療では、Treg 細胞をどのように制御するかが今後の重大な鍵になると考えられている。

Treg 細胞は CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> forkhead box (fox) p3<sup>+</sup> の T リンパ球群であるが、現在知られている最も特異性の高い foxp3 は細胞内分子であるため、siRNA などを用いてその分子の機能を制御することは可能だと考えられるが、現時点で広く受け入れられた方法とは考えにくく、それを標的とした Treg 細胞活性の制御に関する臨床応用は難しい。Treg 細胞表面分子としては、CD25 の他に CTLA-4 や GITR などの発現の優位性が知られているが、そのほとんどが通常の T 細胞の活性化マーカーでもあるため、Treg 細胞を他のリンパ球集団から見分けることが可能な特異的マーカーとはなりえない。近年、EDG1 や CXCR4 といった G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) が Treg 細胞制御に関係すると予測できる報告がなされた。我々もこれまでの研究で Treg 細胞には種々の GPCR が優位に発現している可能性を示唆できる結果を得ている。

このように、Treg 細胞制御には細胞表面上の GPCR 発現パターンと細胞内シグナル、さらには GPCR 刺激による細胞動態を詳細に理解することが重要だと思われる。本研究では、各種 GPCR の Treg 細胞発現を検討し、Treg 細胞優位と考えられる 15 分子を同定することができた。その 15 種 GPCR 分子中 4 分子は、特異的なポリクローン抗体を用いた Treg 細胞染色で比較的強い発現を示す。さらに、それら抗体を用いた Treg 細胞除去により、効果的に免疫抑制活性を取り除くことができる初期的実験にも成功した。このように、本研究においては、GPCR 分子が Treg 細胞の動態と制御において極めて重要だという世界で初めての見解を示すことができ

た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：内科・皮膚科学

キーワード：皮膚免疫学

### 1. 研究開始当初の背景

我々のメラノーマ免疫応答の研究で同定された抑制性細胞表面タンパク質の多くが、近年特に注目を集めているGタンパク質共役型受容体である。Gタンパク質共役型受容体が細胞外の情報伝達物質（リガンド）と結合すると、細胞内のGTP結合タンパク質と共役することにより、細胞内カルシウムの濃度変化やタンパク質リン酸化酵素の活性化、さらには種々の細胞代謝変化を引き起こす。そのため、Gタンパク質共役型受容体は生体の基礎的機能及び高次機能の双方において極めて重要な機能分子であり、この受容体の活動をコントロールすることは、神経、免疫、血圧、代謝に関係する多くの疾患の制御及び治療に応用可能だと考えられている。また、近年のポストゲノム時代にあって、ゲノム解析研究から得られる遺伝情報から、未同定のGタンパク質共役型受容体が数多く存在することが明らかになり、我々が免疫抑制性細

胞から同定したGタンパク質共役型受容体も、これまでに何の情報もない未知の受容体が含まれていることから、それらの機能の詳細な解析は、新しい治療薬及び診断薬開発を飛躍的に向上させる知見を提供できる可能性がある。これまでに、Gタンパク質共役型受容体の機能と免疫応答に関しては、Gタンパク質共役型受容体群として知られている数々のケモカインレセプターとリンパ球遊走機序に関する報告が見られるが、免疫機能の本質に関わる、免疫抑制細胞動態とGタンパク質共役型受容体に関する報告は無く、本研究で得られる成果は分子レベルであらゆる免疫応答の全体像を考える上で極めて重要であることは勿論、GPCR分子の多くが機能の判明していない今日、先駆的なさきがけ研究となることは間違いない。

### 2. 研究の目的

本研究では、高次機能としての免疫反応を、

抑制性細胞表面タンパク質として我々が既に同定した種々のGタンパク質共役型受容体への刺激による抑制性の免疫細胞の動態変化という側面から観察し、特にメラノーマ免疫応答における抑制性免疫応答とそれら受容体の関連を明確にすることを目的とする。メラノーマ障害性免疫応答の活性化を惹起しうる免疫抑制性細胞活性の低下に関連した受容体が発見されたならば、それら受容体タンパク質の構造変化に基づいたペプチド新薬を開発し、Gタンパク質共役型受容体をターゲットとした抑制性免疫応答低下による新たなメラノーマ免疫治療法の開発を目指す。既に先進的な免疫治療法として注目されている経皮的メラノーマ免疫治療法とGタンパク質共役受容体刺激による抑制細胞活性減弱法との併用は、近い将来有効なメラノーマ免疫治療法の基礎となるに違いない。また、本研究により達成されるGタンパク質共役型受容体刺激による免疫抑制応答制御法は、メラノーマを含めた癌ばかりでなく、感染症の治療へ適用することも可能だと考えられる。逆に、免疫抑制応答を増幅しうるGPCR分子が判明したならば、現代病として多くの患者がいるアレルギー疾患全般の治療法に結びつくことは勿論、臓器移植の際の補助処置となる可能性もある。このように、本研究で得られる成果は、皮膚疾患を含めた幅広い疾患の免疫学的制御に不可欠な医学的知識を世界に広く提供できることばかりでなく、あらゆる免疫関連疾患治療法開発の際の即戦力になることは間違いない。

### 3. 研究の方法

本研究では、免疫抑制応答におけるGタンパク質共役型受容体の役割を解明した上で、その情報を基に受容体のアゴニスト及びアンタゴニストを作製し、それらを用いたメラ

ノーマ免疫応答の制御法を開発する。手順としては、Gタンパク質共役型受容体を特異的に解析できる物質の作製をし、それを用いた細胞性の免疫学的解析をする。さらには、免疫制御に重要なGタンパク質共役型受容体については、低分子アゴニストまたはアンタゴニストの開発と創薬的研究を実施し、メラノーマ免疫治療応用への第一歩を目指す。

#### (1) ヒト及びマウスの各種抑制性細胞表面Gタンパク質共役型受容体特異的抗体の作製 抑制性のTreg細胞または制御性 $\gamma$ $\delta$ T細胞に優位に発現するGタンパク質共役型受容体の強制発現細胞株の作製

- ①：CD4、CD25、 $\gamma$   $\delta$  T細胞抗原レセプター (TCR) 磁気ビーズを用いて、ヒト末梢血リンパ球及びマウス脾細胞からCD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg細胞または $\gamma$   $\delta$  T細胞を単離し、それら細胞のcDNAから前研究から同定された抑制性細胞優位なGタンパク質共役型受容体であるEDG1を含む4種のGタンパク質共役型受容体の全長cDNAをPCRをにより単離する。
- ②：①で作製した受容体cDNAをpRc/CMVベクターに挿入し、DH5 $\alpha$ を用いて目的遺伝子挿入ベクターだけを大量に調製する。
- ③：②で作製したGタンパク質共役型受容体cDNA挿入pRc/CMVベクターを、エレクトロポレーション法にてBALB3T3またはL929細胞株に導入し、高発現株のクローニングなどを行い4種Gタンパク質共役型受容体強制発現細胞株を樹立する。

#### (2) ヒトまたはマウス抑制性細胞に優位な4種Gタンパク質共役型受容体に特異的なモノまたはポリクローン抗体の作製

- ①：(1) -③で作製した抑制性細胞優位Gタンパク質共役型受容体強制発現BALB3T3細胞株をBALB/cマウスに2週間おきに3回腹腔内投与による免疫を行い、4種受容体に特異的なポリクローン抗体を作製する。
- ②：(2) -①の免疫マウス脾細胞をP3-X63などのミエローマと融合し、HAT培地選択、(1) -③で作製した受容体強制発現L929細胞株によるスクリーニング、陽性細胞のクローニングを行い、4種抑制性細胞優位Gタンパク質共役型受容体に特異的なモノクローン抗体を作製する。

#### (3) ヒト及びマウス4種抑制性細胞優位Gタンパク質共役型受容体のアゴニストまたはアンタゴニストの作製

抑制性細胞優位Gタンパク質共役型受容体特異的抗体のアゴニストまたはアンタゴニスト作用の探求

①：(1) - ②で作製したGタンパク質共役型受容体特異的ポリクローンまたはモノクローン抗体固層化プレート上で、ヒトまたはマウスCD4+ CD25+ Treg細胞及び $\gamma$   $\delta$  T細胞を培養した時に、それら細胞の増殖能が変化するかをCFSEを用いた増殖アッセイで観察する。この時、培養上清も分取する。

②：(2) - ①で分取した培養上清を、IL-4を用いたTh2細胞の分化培養液中にまたはIL-12を用いたTh1細胞分化培養液中に種々の濃度で添加した際の分化依存的増殖能の変化をCFSEを用いた増殖アッセイで観察する。

③：(2) - ①でポリクローンまたはモノクローン抗体固層化プレート上で培養したCD4+CD25+Treg細胞及び $\gamma$   $\delta$  T細胞を、IL-4を用いたTh2細胞の分化培養液中にまたはIL-12を用いたTh1細胞分化培養液中に種々の細胞数で添加した際のTh1細胞またはTh2細胞の分化依存的増殖能の変化をCFSEを用いた増殖アッセイで観察する。

(4)：抑制性細胞優位Gタンパク質共役型受容体を認識する低分子(ペプチド)物質の作製(創薬的研究)

①：(1) - ②で作製したGタンパク質共役型受容体特異的4種それぞれのポリクローンまたはモノクローン抗体結合カラムと、それにそれぞれのタンパク質を強発現させたL929細胞株抽出液を用い、アフィニティー法で4種それぞれのGタンパク質共役型受容体タンパク質を精製する。

②：ランダムな30塩基程度の合成cDNAをM13系ファージベクターに組み込み、大腸菌に感染させることにより、ランダムペプチドのファージライブラリを作製する。

③：(4) - ①で作製した4種それぞれのGタンパク質共役型受容体タンパク質を固層化したプレートを用い、(4) - ②で作製したファージライブラリーをスクリーニングすることによって、それぞれの受容体に特異的なペプチドファージを選択する(1次スクリーニング)。

④：(4) - ③で選択したペプチドファージを、それぞれの受容体強制発現L929細胞株

付着プレートでスクリーニングすることによって、それぞれの受容体細胞外ドメインを認識するペプチドファージを選択する(2次スクリーニング)。

⑤：(4) - ④で選択されたファージを大腸菌感染によるクローン化の後に大量培養する。

⑥：(4) - ⑤でクローン化したファージのペプチド領域をDNA塩基配列から決定する。決定されたペプチド配列をペプチド合成機で合成する。

(5)：抑制性細胞優位Gタンパク質共役型受容体を認識するペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト作用の解析(創薬的研究)

①：(4)で作製された4種それぞれのGタンパク質共役型受容体に結合性のペプチドを用い、2-1と同様のアッセイを行うことにより、それぞれのペプチドの抑制性細胞へのアゴニストまたはアンタゴニスト作用を解析する。

(6)メラノーマ移植マウスへの抑制作用アゴニストまたはアンタゴニスト物質の投与による臨床応用への基礎研究

①：(3)、(4)、(5)で抑制性免疫細胞へのアゴニストまたはアンタゴニスト作用を持つ抗体またはペプチドが同定されたならば、B16細胞移植1週間目のB6マウスにそれら抗体またはペプチドをあらゆる濃度で静脈注入し、その後の免疫応答の変化(B16腫瘍中や脾臓や肝臓やリンパ節中のCTL、Th1細胞、Th2細胞、NK細胞マクロファージのフローサイトメーターによるポピュレーションやサイトカイン産生能の解析)やB16腫瘍増殖の変化を解析する。

②：(6) - ①で行ったアゴニストまたはアンタゴニスト作用を持つ抗体またはペプチドのB16移植B6マウスへの注入法と、TRP-2ペプチドを用いた経皮的メラノーマ免疫療法(角質層除去マウス耳翼にTRP-2ペプチドを塗布する方法)を併用した場合、経皮的メラノーマ免疫療法単独、抑制活性アゴニストまたはアンタゴニスト単独で行った場合とどのような違いが見られるか、免疫応答の変化(B16腫瘍中や脾臓や肝臓やリンパ節中のCTL、Th1細胞、Th2細胞、NK細胞マクロファージのフローサイトメーターによるポピュレーションやサイトカイン産生能の解析)やB16腫瘍増殖の変化の観察から詳細に解析

する。

#### (7) ヒトメラノーマへの抑制作用アゴニストまたはアンタゴニストの応用

①：(1)、(2)で同定されたヒト Treg 細胞またはヒト  $\gamma\delta$ T 細胞上の G タンパク質共役型受容体アゴニストまたはアンタゴニスト抗体やペプチドを、メラノーマ患者末梢血リンパ球培養液中に添加した時のリンパ球ポピュレーションの変化を、CTL、Th1 細胞、Th2 細胞、NK 細胞マクローファージのフローサイトメーターによるポピュレーションやサイトカイン産生能のフローサイトメーターによる解析や培養後に得られるリンパ球のメラノーマ細胞の障害アッセイにより検討する。

#### (8) ヒトメラノーマ治療への臨床応用

上記(1)～(7)までの結果を基に、現在行っている経皮的メラノーマ免疫療法の臨床試験に、(3)、(4)で得られる抑制活性アンタゴニストを応用するプロトコル及びガイドラインを検討する。

## 4. 研究成果

抗腫瘍免疫応答は抑制性の免疫応答によって抑えられる。抑制性の機能を担う細胞としては制御性 T 細胞 (Treg) や NKT 細胞や  $\gamma\delta$  T 細胞の亜集団が知られており、それら免疫抑制性リンパ球優位細胞表面タンパク質をサブトラクション法やポリクローン抗体作製法により詳細に調べた結果、メラノーマ傷害性の免疫応答を抑制する Treg 表面タンパク質の多くが、生体の高次機能制御において極めて重要な G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であることが判明した。そのため、この受容体の発現パターンの解析と分子機能を詳細に解析することは、メラノーマ免疫応答の制御機構の全体像を知る上で極めて重要な上、新しいがんの治療薬及び診断薬開

発に大きな一助となる可能性があるためさらなる検討を行った。GPR91, P2Y13, alc-adorenoceptor(ado), ald-ado, Edg2, P2Y1, alb-ado, Edg6 や未知 7 分子を含む 15 種類の GPCR は、CD25 陽性の CD4 細胞を用いたフローサイト分析において細胞内 foxp3 陽性の Treg 細胞上に優位に発現しており、発現量は既に Treg 細胞での発現が知られている Edg1 や CXCR4 と同等程度であった。それら分子陽性の細胞除去末梢血リンパ球の MLR では、どの分子においてもその陽性細胞除去画分は強い増殖能とサイトカイン産生能を示した。さらに MLR でのそれら GPCR 分子特異的抗体添加では、3 種類の分子で増殖能に変化は見られなかったが、程度の差はあれ 3 分子において増殖能の亢進、2 分子において増殖能の低下が観察された。この後行っている各 GPCR 特異的な単クローン抗体取得については、GPCR 分子の複雑な構造から構想通りの作製に至っていないが、Treg 細胞活性をコントロールする GPCR 分子が同定できたことは、今後の有効なメラノーマ免疫治療の開発へ大きな示唆を提供するものだと考えている。

#### 図 1：得られた GPCRs のリアルタイム PCR

得られた種々の GPCR に対して特異的なプライマーを作製し、末梢血リンパ球 (PBMCs) から得られる CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>又は CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>細胞ポピュレーションの cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行った。結果、既に報告されている Treg 細胞分子の EDG1 や CXCR4 といった GPCR と同様に、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> PBMCs に優位に表現されている GPCR 分子 15 種類を同定することができた。

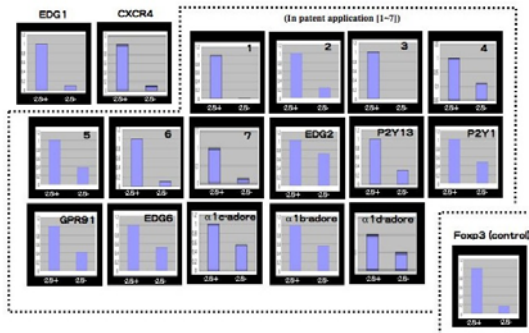


図 2 : 得られた 15 種 GPCRs の培養 Th1 及び Th2 細胞での発現に関する検討

EDG1 分子 mRNA は CD4+ CD25-PBMCs ばかりでなく、PBMCs から CD4+ CD25- CD45RO-ナイーブ T 細胞を PHA (1  $\mu$ g/ml), rIL-2 (50 U/ml), rIL-12(2.5 ng/ml), 抗 IL-4 抗体(5  $\mu$ g/ml)を添加した培養により分化させた Th1 細胞や、PHA (1  $\mu$ g/ml), rIL-2 (50 U/ml), rIL-4(12.5 ng/ml), 抗 IFN- $\gamma$  抗体 (5  $\mu$ g/ml) , サリドマイド (100 ng/ml) を添加した培養により分化させた Th2 細胞から得られる cDNA 中にも存在が確認できない。同様のことは、今回得られた 15GPCRs 中 6 分子で観察された。

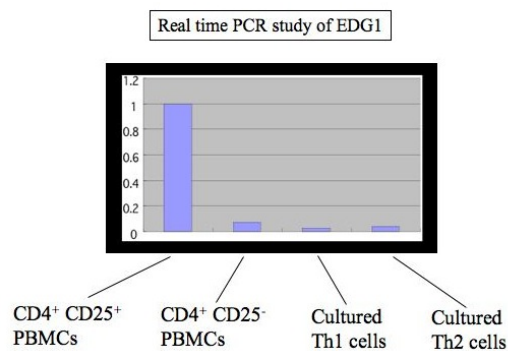


図 3 : 得られた 15 種類の GPCR それぞれに特異的なポリクローン抗体の CD4+ CD25++ PBMC の染色

得られた 15 種 GPCR それぞれに特異的なポリクローン抗体を用いて CD4+ CD25++ の Treg 細胞ポピュレーションへの染色を検討した

結果、全ての GPCRs 抗体は強度の差はあれ CD4+ CD25++ PBMCs を染色するが、なかでも 2、3、5、6 の 4 分子が Treg 細胞上に強く発現されていることが判った。この 4 種 GPCR 分子については、それぞれ遺伝子導入細胞株のマウスへの免疫により単クローン抗体作製を行っているが、十分な免疫が達成されないため、コンピューター解析によって高い抗原性を示すペプチド配列を決定し、その合成ペプチドを用いた免疫による作製法に変え現在も進行中である。

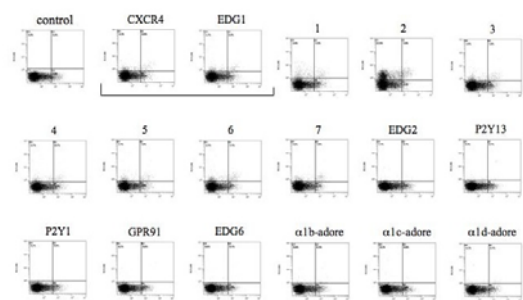
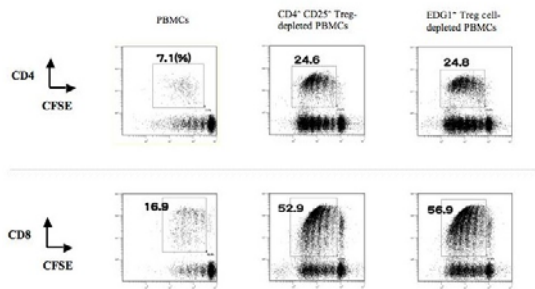


図 4 : Treg 特異的 4 種 GPCRs をそれぞれ除去した PBMCs の増殖能の亢進

Treg 細胞に発現が認められる EDG1+細胞を除去した PBMC 中の CD4+または CD8+細胞は、IL-2 と CD3 刺激によって除去しない場合よりも激しい増殖能を示し、また CD25+細胞除去群と同様の増殖能を示す。同様の結果が CD4+ CD25++Treg 細胞に強い発現が観られる 2、3、5、6 分子陽性細胞をポリクローン抗体と磁気ビーズをもちいた除去した PBMCs の CD4+ 又は CD8+細胞増殖試験にも観られるため、得られた 4 種 GPCR 分子はリンパ球増殖抑制能を持つ Treg 細胞に優位に発現している分子であることが確認された。



## 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 10 件)

- 1) 瀬尾尚宏 : (免疫細胞療法の新たな展開) 表皮ランゲルハンス細胞に注目した経皮ペプチド免疫療法、Biotherapy、23 : 45-51、2009. (査読なし)
- 2) Eri Kuwada, Katsuo Noguchi, Naohiro Seo, Hiromichi Yamashiro, Kohji Egawa. A novel strategy of cancer gene therapy by transcriptional targeting of allogeneic histocompatibility class Ia transgene utilizing a tumor antigen gene promoter. Anticancer Research, 2009. (in press). (査読あり)
- 3) Hideo Hashizume, Naohiro Seo, Yasushi Yoshinari, Akihiro Ohshima, Natsuho Ito, Masahiro Takigawa, Hiroaki Yagi: The pathogenic roles of induced CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in atopic dermatitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009 (in press). (査読あり)
- 4) Naohiro Seo, Hiroaki Yagi, Hideo

Hashizume, Masahiro Takigawa: Basic and clinical aspects of epidermal Langerhans cell-based tumor immunotherapy. Expert Review of Dermatology. 2: 725-733, 2008. (査読あり)

5) Hideo Hashizume, Naohiro Seo, Taisuke Ito, Masahiro Takigawa, Hiroaki Yagi: Promiscuous interaction between gold-specific T cells and antigen-presenting cells in gold allergy. Journal of Immunology 181: 8096-8102, 2008. (査読あり)

6) Naohiro Seo, Hiromichi Yamashiro, Toshimasa Tadaki: Anti-infective and -tumor agents based on depletion of immune suppressive effects. Current Medical Chemistry. 15: 991-996, 2008. (査読あり)

7) Taisuke Ito, Hidekazu Fukamizu, Natsuho Ito, Naohiro Seo, Hiroaki Yagi, Masahiro Takigawa, Hideo Hashizume. Roxithromycin antagonizes catagen induction in murine and human hair follicles: implication of topical roxithromycin as hair restoration reagent. Archives of Dermatological Research. Sep. 27 [Epub ahead of print] 2008. (査読あり)

8) Naohiro Seo: Future issues of percutaneous peptide immunization against tumor from the standpoint of effective activation of tumoricidal cytotoxic T lymphocytes and epidermal Langerhans cells. Current Topics of Peptide & Protein Research. 3: 121-128, 2008. (査読なし)

9) Naohiro Seo, Masahiro Takigawa: The current status and future direction of percutaneous peptide immunization against melanoma. Journal of Dermatological Science, 48: 77-85, 2007. (査読あり)

10) Hiroaki Yagi, Hideo Hashizume, Takahiro Horibe, Yasushi Yoshinari, Maki Hata, Akihiro Ohshima, Taisuke Ito, Masahiro Takigawa, Akihiko Shibaki, Hiroshi Shimizu, Naohiro Seo: Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. Cancer Research, 66: 10136-10144, 2006. (査読あり)

11) Akihisa Hiroi, Taisuke Ito, Naohiro Seo, Koji Uede, Takashi Yoshimasu, Ito M, Nakamura K, Natsue Ito, Ralf Paus, Fukumi Furukawa: Male New Zealand Black/KN mice: a novel model for autoimmune-induced permanent alopecia? British Journal of Dermatology 155: 437-445, 2006. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1) 瀬尾尚宏: がん免疫治療に有用な免疫抑制除去のために標的分子探索、第6回日本免疫治療学研究会 (教育講演)、東京、2009、2.

2) Naohiro Seo, Hideo Hashizume, Taisuke Ito, Masahiro Takigawa: G protein-coupled receptors (GPCRs) have a possibility to modulate Treg cell activities. International Conference on Regulatory

T cells and Clinical Application in Human Disease, Beijing, 2008, 10.

3) 瀬尾尚宏: 我が国初の経皮的な抗原塗布によるメラノーマ免疫治療を実施してきた当科の基礎研究統括者として感じる事、第5回日本免疫治療学研究会 (シンポジスト)、新横浜、2008、3.

4) 瀬尾尚宏: 抗メラノーマ免疫と免疫抑制、第8回静岡皮膚 up-to-date (招待講演)、静岡、2006、2.

5) Taisuke Ito, Masahiro Takigawa, Naohiro Seo: Alopecia areata model mouse induced by depletion of regulatory T cells. The 31st Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology (Plenary), Kyoto, 2006, 6.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬尾 尚宏 (SEO NAOHIRO)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50283354

### (2) 研究分担者



なし

### (3) 連携研究者

八木 宏明 (YAGI HIROAKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20242779