

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592369

研究課題名（和文） 破骨細胞におけるカテプシンEの役割と創薬にむけた基質分子の探究

研究課題名（英文） The role of cathepsin E in osteoclast and the research for substrate molecule binding with cathepsin E

研究代表者

岡元 邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10311846

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞への分化・活性化において RANK (Receptor Activator of NF- κ B)/RANKL (RANK Ligand), OPG (Osteoprotegerin)の系と Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)/c-fms の系は重要なシグナル伝達経路である。カテプシンE (CE) の欠損マウスは破骨細胞の形成において、野生型マウスと比較して有意な破骨細胞数の減少が認められたため、これらの経路を含めた解析を進めてきた。破骨細胞数の減少と一致して、リアルタイム PCR では、M-CSF および RANKL の膜表面受容体 c-fms、RANK、シグナル経路の c-fos、破骨細胞特異的マーカーであるカテプシン K、酒石酸耐性アルカリホスファターゼ、等には発現の減少傾向にはあるものの、統計学的に有意な差は認められなかった。また、破骨細胞前駆細胞の融合に関係しているといわれている DC-STAMP と OC-STAMP についても同様の結果であった。そこで、包括的に細胞内の mRNA の発現を調べるために、Microarray 解析を行った。すると、いくつかの因子の上昇あるいは下降が認められたが、その中で、酸化ストレスに関する因子の上昇が認められた。そこで、RANKL 添加前と添加後の過酸化水素水を測定したところ、CE 欠損マウスにおいて過酸化水素水産生量の上昇が認められた。つまり、CE 欠損マウスは何かの原因で酸化ストレスを受けている可能性が示唆される結果となった。また、オートファジー関連分子について解析を行ったところ、p62、LC3、ユビキチンが、細胞可溶画分から不溶画分へと移動した。この結果と、破骨細胞数の減少に酸化ストレスが関与している、という結果と考えあわせると、CE 欠損マウスにおける破骨細胞数の減少はオートファジーが亢進し、破骨細胞のミトコンドリアにダメージが生じ、破骨細胞の形成に抑制が生じたことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

An axis of RANK (Receptor Activator of NF- κ B)/RANKL (RANK Ligand), OPG (Osteoprotegerin) and Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)/c-fms is one of the most important signal pathways in differentiation and activation of osteoclast. In previous study, we reported that number of osteoclast significantly decreased in cathepsin E (CE) knockout mice. In this time, real time PCR analyses showed that mRNA expression levels of M-CSF, c-fms, RANK, c-fos and osteoclast specific marker, cathepsin K and TRAP tended to decrease in CE KO mice, although no statistical differences were recognized. Moreover, mRNA of fusion-related protein such as DC-STAMP and OC-STAMP also decreased. Therefore, we examined mRNA profile with wild (C57BL/6) and CE KO mice using DNA microarray. Then, lots of factors related with oxidative stress significantly increased in CE KO mice compared with wild type mice. Furthermore, hydrogen peroxide also increased in CE KO mice after adding RANKL. Studies of autophagy related molecules such as p62, LC3 and ubiquitin showed

that they migrated toward non soluble fraction from soluble fraction. These results suggest that CE deficiency causes impairment of autophagy, a degradation system for aggregated proteins and damaged organelles, and increase of oxidative stress. Finally, number of osteoclast significantly decrease in CE KO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞，骨粗鬆症，プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞とプロテアーゼとの関連性を示すものとして、システインプロテアーゼのカテプシンKとメタロプロテアーゼのMMP-9があげられる。カテプシンKについては、波状縁から分泌され、コラーゲンを分解することが報告され、欠損マウスによる解析も行われた (Saftig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; Gowen M., et al., *J. Bone Miner. Res.*)。ヒトにおいてもカテプシンKの欠損が骨格系に異常をきたすことが報告されている (Ho N., et al., *J. Bone Miner. Res.*) また、MMP-9 についても、骨との関連性が報告されている (Vu T.H., et al., *Cell*)。その他のプロテアーゼについては、細胞内でのエンドソーム・リソソーム系によるエンドサイトーシスにより取り込んだ骨基質の分解に関与している可能性が示唆されている。我々は以前から、宿主由来のプロテアーゼとして細胞内アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンDとEについて研究を行ってきた。すでに、カテプシンDの欠損マウスに関しては、ドイツ・ゲッチンゲン大学のP. Saftigらの供与により入手していたので、これらの欠損マウスを用いて、破骨細胞の分化における細胞内プロテアーゼの関与を検討したところ、カテプシンDの影響はほとんど認められなかった。おそらく他のプロテアーゼの代償作用が働いたものと考えられる。カテプシンEは、破骨細胞におけるその局在に関してやや

カテプシンDと異なり、活性化された破骨細胞の波状縁にカテプシンEの強い免疫反応を示している (Yoshimine et al., *Cell Tissue Res*)。しかしながら、その機能についてはほとんど知られていない。そこで、我々はカテプシンEの阻害薬であるペプスタチンAを破骨細胞形成時に作用させたところ、ペプスタチンAの濃度依存的に破骨細胞形成が抑制された (Yoshida H., Okamoto K., et al., *J. Biochem.* Okamoto K.: corresponding author)。我々は、以前よりカテプシンEの欠損マウスの作製を行っており、この酵素がアレルギー性疾患に関係していることを明らかとしている (Tsukuba T., Okamoto K., et al., *J. Biochem.* Tsukuba T., Okamoto K.: equally contribute)。また、最近では、この酵素の欠損マウスが *P. gingivalis* を含む様々な細菌の感染に非常に感受性が高いことも明らかとされ、本酵素の生体内での役割の重要性が指摘されるようになって来た。

2. 研究の目的

近年、破骨細胞への分化・活性化において M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) とその受容体である c-fms が、また RANK (Receptor Activator of NF-κB)/RANKL (RANK Ligand) と OPG (Osteoprotegerin) がこれらを厳密に制御している機構の一つであることが明らかとされた。そこで、我々は前回までの科学研究費

においてカテプシンEの欠損マウスの大腿骨より骨髓細胞を採取し、RANK/RANKLの系を利用して破骨細胞を作成した。カテプシンEの欠損マウスからの破骨細胞形成において、野生型と破骨細胞数に差が認められることから、膜表面タンパク質の発現に差があるのではないかと考え、タンパク質レベルで比較したところ、24時間（破骨細胞前駆細胞の時期）ではc-fmsの発現は減少していた（図3）。しかしながら、他の膜表面タンパク質RANKや細胞内シグナル伝達については差が認められなかった。これらのことから、カテプシンEは骨の形成および破骨細胞への活性化におけるM-CSFとc-fmsの系が何らかの働きをしている可能性が示唆された。そこで我々は、さらに研究を進め、カテプシンEが破骨細胞の形成および活性化を抑制する作用機序を解明し、骨疾患における新たな創薬ターゲットを探究したいと考えている。

3. 研究の方法

(1) リアルタイムPCRを用いた破骨細胞形成および活性化因子の発現

生後5～8週のカテプシンEの野生型および欠損型マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、直径100mmのプレートに50ng/mlのM-CSFを添加した α -MEM/10%FCSで1日培養後、その上清を回収し、さらに同様の培養液で3日間培養する。付着した細胞を回収後、直径60mmのプレートに30ng/mlのM-CSFと50ng/mlのRANKLを添加した α -MEM/10%FCSで培養する（ 5×10^5 cells/ml）。培養開始より経時的にtotal RNAを採取し、これをテンプレートにしてReverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を行う。プライマーには破骨細胞形成および活性化に必要な因子、c-fms, RANK, NFATc1などを用い、リアルタイムPCRで定量的に解析を行う。RANKに関しては、ゲル電気泳動では差があまり認められなかったが、破骨細胞膜受容体であるので、mRNAレベルで変化が認められなくてもタンパク質の輸送システムに違いがある可能性があるため、次のフローサイトメトリー（FACS）で膜表面の発現を調べる。

(2) カテプシンE欠損における破骨細胞のMicroarray解析

破骨細胞は基本的に前駆体細胞から単核の破骨細胞へ分化する段階と、単核の破骨細胞が融合して多核の破骨細胞になる2つの過程に分けられる。当然のことながら、それぞれの過程において発現し機能する分子は異なるものも多く存在すると思われる。特に、後半の融合過程においては今だ不明な点が多い。ここでは、RANKL添加後1日目から2日目の単核の破骨細胞で発現してくる遺伝子と、2日目から3日目の破骨細胞の融合時期に発現してくる遺伝子を網羅的に解析する。

(3) Yeast Two Hybrid Systemを用いた新しい基質の探究

ベイトベクターの作製には、CLONTECHから発売されているMATCHMARKER Two-Hybrid System 3を用いる。この系は、他の実験（マウス胎児からライブラリーを作製し、カテプシンEの基質分子を探究した）で使用しているので、カテプシンE遺伝子はpGBKT7 vectorに挿入し作製済みである。カテプシンEはタンパク質分解酵素であるので、基質と結合後すぐに分解する可能性も考慮して、カテプシンEの活性中心を変異させたプラスミドも同時に作製しているため、両方用いて解析を行う。ライブラリーに関しては、マウス胎児からライブラリーを作製したのと同じ手法を用いて、新たにマウス破骨細胞からライブラリーを作製する。

宿主は酵母AH109株を用い、酢酸リチウム法により作製されたコンピテント細胞に、作製したカテプシンE遺伝子の挿入されたプラスミドを導入する。次にその酵母を同じく酢酸リチウム法によってコンピテント化し、マウス破骨細胞からのライブラリーを導入する。これをYPAD/-His/-Leu/-Trpプレートにプレーティングし、HIS3の発現についてスクリーニングを行う。さらに、His+コロニーをYPAD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -galプレートにまき、ADE2とMEL1の発現についてスクリーニングを行う。得られたコロニーからプラスミドDNA（これにはカテプシンEの挿入されたプラスミドと目的の結合タンパク質の挿入されたプラスミドの2つが含まれている）を大腸菌へトランスフォーメーションし、アンピシリンで選別する（目

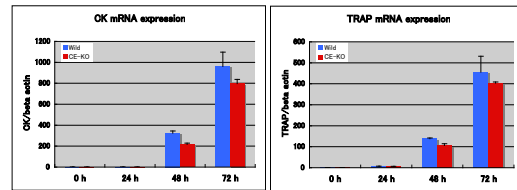
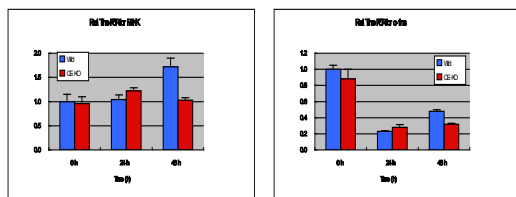
的結合タンパク質の挿入されたプラスミドにはアンピシリン耐性遺伝子が含まれているが、カテプシンEの挿入されたプラスミドには含まれていない。

実際に取りえてきた結合タンパク質の遺伝子の塩基配列を決定し、既知のものであるかどうかの確認をインターネットを利用し行う。この情報と(2)のMicroarrayからの情報を照らし合わせながら、カテプシンEの基質となりうる破骨細胞関連遺伝子を見つける。さらに確認として、カテプシンEと基質蛋白質の結合実験を行う。目的の結合タンパク質の挿入されたプラスミドにはmyc-tagが挿入されており、またT7プロモーターもあるため、*in vitro*で転写および翻訳させ、*in vitro*反応させた後c-MycやカテプシンE抗体で免疫共沈降を行う。

4. 研究成果

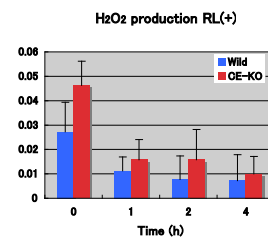
(1) リアルタイムPCRを用いた破骨細胞形成および活性化因子の発現

破骨細胞への分化・活性化においてRANK (Receptor Activator of NF- κ B)/RANKL (RANK Ligand), OPG (Osteoprotegerin)の系とMacrophage colony stimulating factor (M-CSF)/c-fmsの系は重要なシグナル伝達経路である。カテプシンE (CE)の欠損マウスは破骨細胞の形成において、野生型マウスと比較して有意な破骨細胞数の減少が認められたため、これらの経路を含めた解析を進めてきた。破骨細胞数の減少と一致して、リアルタイムPCRでは、M-CSFおよびRANKLの膜表面受容体c-fms、RANK、シグナル経路のc-fos(図省略)、破骨細胞特異的マーカーであるカテプシンK、酒石酸耐性アルカリホスファターゼ、等には発現の減少傾向にはあるものの、統計学的に有意な差は認められなかった。また、破骨細胞前駆細胞の融合に関係しているといわれているDC-STAMPとOC-STAMPについても同様の結果であった(図省略)。



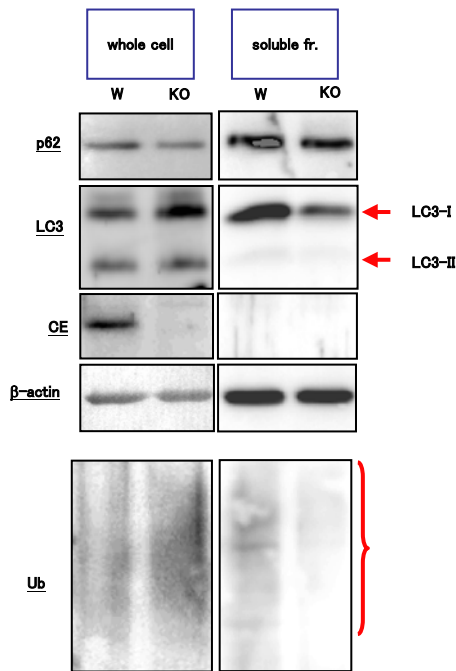
(2) カテプシンE欠損における破骨細胞のMicroarray解析

そこで、包括的に細胞内のmRNAの発現を調べるために、RANKL添加後24時間での細胞を回収し、mRNAを採取、Microarray解析を行った。すると、いくつかの因子の上昇あるいは下降が認められたが、その中で、酸化ストレスに関する因子(peroxiredoxin1)の上昇が認められた。そこで、RANKL添加前と添加後の過酸化水素水を測定したところ、CE欠損マウスにおいて過酸化水素水産生量の上昇が認められた。つまり、CE欠損マウスは何かの原因で酸化ストレスを受けている可能性が示唆される結果となった。



(3) オートファジー関連分子の探究

我々は最近、CE欠損マウスからの腹腔マクロファージでオートファジーが亢進している結果を得ており、オートファジー関連分子のp62やLC3-I, -IIの発現が細胞の不溶画分で上昇していることなどを明らかにしてきた。そこで、これらをもとに破骨細胞におけるオートファジー関連分子の挙動について解析を行った。腹腔マクロファージと同様に、破骨細胞前駆細胞においても、可溶画分におけるp62の発現の減少を認めた。LC3についてもLC3-IとLC3-IIの発現が減少しLC3-IIの比率が上昇している可能性が示唆された。また、細胞質におけるタンパク質の分解系であるユビキチンの発現の減少も認められた。すなわち、オートファジー関連分子が、可溶画分から不溶画分へと移動したものと考えられる。



この結果と、破骨細胞数の減少に酸化ストレスが関与している、という結果と考えあわせると、CE 欠損マウスにおける破骨細胞数の減少はオートファジーが亢進し、破骨細胞のミトコンドリアにダメージが生じ、破骨細胞の形成に抑制が生じたことが示唆された。

(4) Yeast Two Hybrid System を用いた新しい基質の探究

酵母の Yeast Two Hybrid System を用いて、新たな基質の探索も同時に試みた。手始めに、すでに作製してあった胎児のマウスからライブラリーを作製し、これと成熟型 CE や活性中心に変異を入れたベイトとの結合を調べた。CE と結合するいくつかの分子が見つかり、塩基配列を決定することで、既知か未知の分子であるか明らかにされた。しかしながら、破骨細胞でのみ発現しているような分子は認められなかった。また、先に明らかとされた酸化ストレスに関する分子は、この Yeast Two Hybrid System では見つからなかった。

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 5 件)

- ① Tsukuba T, Yanagawa M, Okamoto K, Okamoto Y, Yasuda Y, Nakayama K-I, Kadowaki T and Yamamoto K. Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J. Biochem.*, 145, 565-573, 2009.
- ② Yasuda Y, Ohtomo E, Tsukuba T, Okamoto K, Saito T. Carbon dioxide laser irradiation stimulates mineralization in rat dental pulp cells. *Int Endod J.* 42, 940-946, 2009.
- ③ Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K, Okamoto Y, Nakamura S and Yamamoto K. The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes. *Biol. Chem.* 392, 571-585, 2011.
- ④ Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K and Tsukuba T. Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J. Cell. Biochem.* 113, 486-98, 2012.
- ⑤ Okamoto K, Okamoto Y, Kawakubo T, Iwata J, Yasuda Y, Tsukuba T and Yamamoto K. Role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the murine cathepsin E gene. *J. Biochem.* 151, 263-272, 2012.

[学会発表] (計 2 3 件)

- ① 筑波隆幸, 柳川三千代, 門脇知子, 岡本美子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 山本健二: カテプシンE欠損によるオートファジー低下とそれに伴うミトコンドリア機能低下と酸化ストレスの増大, 第 14 回日本病態プロテアーゼ学会, 2009.
- ② 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸: 鉄代謝を介した新規の破骨細胞分化機構, 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009.
- ③ 筑波隆幸, 門脇知子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 山本健二: カテプシンE欠損マクロファージにおけるオートファジーの低下とそれ

- に伴うミトコンドリア機能異常と酸化ストレスの上昇, 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009.
- ④ Takayuki Tsukuba, Michiyo Yanagawa, Tomoko Kadowaki, Yoshiko Okamoto, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: IMPAIRMENT OF AUTOPHAGY ACCOMPANIED BY INCREASED ABERRANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS IN CATHEPSIN E DEFICIENT MACROPHAGES, 5th International Symposium on Autophagy, 2009.
- ⑤ 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 福間 裕, 西下一久, 内藤真理子, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸: 破骨細胞分化における鉄代謝とミトコンドリアストレスの重要性, 第 33 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2009.
- ⑥ Takayuki Tsukuba, Michiyo Yanagawa, Tomoko Kadowaki, Yoshiko Okamoto, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Autophagy impairment associated with increased aberrant mitochondria and oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophage 第 83 回日本薬理学会年会, 2010.
- ⑦ Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Tomoyo Kawakubo, Kenji Yamamoto, Takayuki Tsukuba: Transcription factor Spl regulates the expression of the murine cathepsin E gene in gastric adenocarcinoma cells, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010.
- ⑧ 筑波隆幸, 岡元邦彰: カテプシン群によるメンブレントラフィックへの影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010.
- ⑨ 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸: HO-1 は HMGB1 の遊離を抑制し破骨細胞形成を阻害する, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010.
- ⑩ 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 福間 裕, 坂元 裕, 文元玲子, 山口 優, 山本健二, 筑波隆幸: カテプシン E 欠損における破骨細胞分化への影響, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010.
- ⑪ 坂井詠子, 西下一久, 福間 裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: HO-1 の発現誘導は RANKL を介した HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化を阻害する, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010.
- ⑫ Eiko Sakai, Megumi Shimada, Kazuhiisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto, Takayuki Tsukuba: Receptor activator of NF- κ B ligand dependent heme oxygenase-1 suppression is required for high mobility group box 1 release, caspase-3 activation, and subsequent osteoclastogenesis. 第 84 回日本薬理学会, 2011.
- ⑬ Reiko Fumimoto, Hiroshi Sakamoto, Yu Yamaguchi, Eiko Sakai, Kuniaki Okamoto, Takayuki Tsukuba: Nrf2 activators inhibit osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B ligand. 第 84 回日本薬理学会, 2011.
- ⑭ 文元玲子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Kahweol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of Kahweol on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011.
- ⑮ 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *tert*-Butylhydroquinone の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of *tert*-Butylhydroquinone on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011.
- ⑯ 坂元裕, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Deltamethrin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of deltamethrin on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011.
- ⑰ 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: RANKL 依存的な HO-1 発現抑制は HMGB1 の遊離に必要である (Suppression of RANKL-dependent HO-1 is required for HMGB1 release.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011.
- ⑱ 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞分化における RANKL 依存的な HO-1 発現抑制の役割, 第 64 回西南部会, 2011.
- ⑲ 菅原めぐみ, 坂井詠子, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: フィセ

チンによる破骨細胞分化抑制作用, 第64回西南部会, 2011.

- ⑳ Megumi Sugawara, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto, Noriaki Yoshida, Takayuki Tsukuba: Fisetin prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation. 第85回日本薬理学会, 2012.
- ㉑ Eiko Sakai, Megumi Sugawara, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto, Takayuki Tsukuba: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. 第85回日本薬理学会, 2012.
- ㉒ Takayuki Tsukuba, Tomoko Kadowaki, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Accumulation of NADPH oxidase (NOX2) and increased oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophages. 第85回日本薬理学会, 京都, 2012.
- ㉓ Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Kenji Yamamoto, Takayuki Tsukuba: Identification of two transcripts and in vivo promoter analysis for cathepsin E. 第85回日本薬理学会, 2012.

[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

岡元 邦彰 (Okamoto Kuniaki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 10311846

(2) 研究分担者

筑波 隆幸 (Tsukuba Takayuki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30264055

研究分担者

西下 一久 (Nishishita Kazuhisa)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 20237697

研究分担者

坂井 詠子 (Sakai Eiko)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10176612

(3) 連携研究者

なし