

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591358

研究課題名(和文)新規ペプチドNERPおよび新規グラニン由来ペプチドのインスリン分泌制御機能の探索

研究課題名(英文)Mining of novel granin-derived bioactive peptides that regulate insulin secretion.

研究代表者

山口 秀樹(YAMAGUCHI, Hideki)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10305097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：新規ペプチドNERPsは膵ラ氏島に局在しインスリンと共存した。NERP-2は高グルコース条件下で単離膵ラ氏島からのインスリン分泌を用量依存性に促進し、マウス腹腔内投与でグルコース誘発性インスリン分泌を促進した。NERP-2の非アミド体であるNERP-2-GlyとNERP-1は生理活性を認めなかった。MIN6細胞株へのNERP-2添加で細胞内Ca上昇活性を認めた。NERP-2はグルコース応答性インスリン分泌反応を促進する新たな生理活性ペプチドである。

研究成果の概要(英文)：To explore the physiological roles of NERP-2 in the pancreas, we examined its effects on insulin secretion. We detected NERP-2 immunoreactivity in pancreatic islets, where it co-localized extensively with insulin. NERP-2 increased glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in a dose-dependent manner from isolated mouse pancreatic islets. NERP-2 significantly augmented GSIS after administration to rodents. Neither NERP-1 nor NERP-2-Gly (non-amidated NERP-2) stimulated insulin secretion. Calcium-imaging analysis demonstrated that NERP-2 increased the calcium influx in MIN6 cells. These findings show that NERP-2 is a novel bioactive peptide to stimulate insulin secretion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生理活性ペプチド 糖尿病 インスリン 膵 細胞

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は高血糖を原因とする多彩な慢性合併症により患者の QOL が低下し社会活動を著しく損なう疾患で、血糖正常化を目指した新たな治療法の開発は重要な課題である。インスリンの膵細胞からの分泌機構の解明は新たな糖尿病治療法の開発につながると期待され、国内外で精力的に研究されている。

新規生理活性ペプチドの同定は、未知の生体の情報伝達・制御機構の発見に繋がり、発症原因に即した治療法や診断法の開発、新たな調節機構に基づく生体内物質を活用した創薬へと展開できる。このような基盤に立ち、我々は細胞間情報伝達・制御に関するペプチド研究を実施し、生体内ペプチドの情報調節機構に基づく有効な診断、治療法を開発することで医療へ貢献するためペプチド研究を推進している。国立循環器病研究センターの佐々木一樹博士、南野直人博士らは、組織、細胞が産生するペプチドの一斉解析を行い、内在するペプチドをカタログ化した後、ペプチド配列などに基づき生理活性ペプチド候補を見出す方法を開発してきた。本法をヒト甲状腺髄様癌培養細胞株に適用した結果、新規視床下部ペプチド NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide, J Biol Chem, 2007)の同定に成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、膵内分泌細胞に局在しインスリン分泌を制御する新たな生理活性ペプチドである NERP-2 の機能解析を行い、糖尿病の新たな診断・治療法を目指したシーズ研究を実施する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物

C57BL/6J マウス (9 週齢, Charles River Laboratories, 横浜), vgf 遺伝子欠損マウス (9 週齢, 南野直人博士により分与), Wistar ラット (9 週齢, Charles River Laboratories) は、室温・湿度を一定に保った 12 時間明暗サイクルの部屋に個別のケージにて自由摂餌・自由摂水で飼育した。動物実験に関しては学内倫理委員会の承認を得て、当研究施設での動物実験指針に従い動物愛護の精神に基づいて行った。

#### (2) 免疫染色

免疫染色は既報 (J Biol Chem 282: 26354-26360, 2007) に従って行った。DAB (3,3'-diaminobenzidine) 染色は、マウス (C57BL6/J and vgf knockout mice) 膵組織を摘出し、4% paraformaldehyde で 24 時間、4°C で固定し、30% sucrose で包埋した。クライオスタットで 7 μm スライス厚の切片を作製した。1% 正常ヤギ血清でブロッキングした後に抗 NERP-1 抗体 (最終希釈濃度 1:1,000)、抗 NERP-2 抗体 (最終希釈濃度 1:2,000) にて 24 時間、4°C で反応させた。

ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を用いて発色させ、Nikon A1Si microscope (Nikon, 東京) で検鏡・観察した。

二重免疫染色では、guinea-pig anti-insulin antiserum (DAKO, Carpinteria, CA) を用いて 24 時間、4°C で反応させ、PBS で洗浄後に抗 NERP-1 抗体 (最終希釈濃度 1:1,000)、抗 NERP-2 抗体 (最終希釈濃度 1:2,000) にて 24 時間、4°C で反応させた。Alexa Fluor™ 568 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) で発色させ、OLYMPUS AX-7 fluorescence microscope (Olympus, 東京) 検鏡・観察した (3) *in vitro* 実験

培養したインスリノーマ細胞株 MIN6 を 48 穴プレート 1 well あたりに 105 個となるように分注した。また、collagenase digestion method で単離した膵ラ氏島を PP チューブ 1 本あたり 10 個、実体顕微鏡下でピックアップした。37°C、95% air/5% CO<sub>2</sub> atmosphere の条件下で 24 時間培養した。

低グルコース溶液 (MIN6 細胞では 5.5 mM、単離膵ラ氏島では 2.8 mM)、高グルコース溶液 (MIN6 細胞では 22 mM、単離膵ラ氏島では 16.7 mM) にラット NERP-1 (10<sup>-6</sup> M), NERP-2 (10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M), NERP-2-Gly (10<sup>-6</sup> M) (Peptide Institute, 大阪)、ヒト GLP-1 (10<sup>-8</sup> M, S Bio Co., Menlo Park, CA) を添加し、培養液中に分泌されたインスリンを Mouse Insulin EIA Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., 横浜) にて測定した。実験終了後に Protein Assay Kit I (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて、各 well または PP チューブ内のタンパク量を測定した。

#### (4) *in vivo* 実験

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 18 時間絶食後、ブドウ糖 (1 g/kg 体重) とラット NERP-2 (500 nmol/kg 体重) またはヒト GLP-1 (4 nmol/kg 体重) を無麻酔・無拘束下でマウス腹腔内に投与し、投与後 90 分まで経時的に採血した。血中インスリン濃度を Mouse Insulin EIA Kit を用いて測定した。

9 週齢の Wistar 系雄ラットを 18 時間絶食後、ペントバルビタール (250 mg/kg 体重、Dainippon Sumitomo Pharma, 大阪) で麻酔し、右大腿静脈内にカテーテルを挿入・留置した。ラット静脈内に、ブドウ糖 (500 mg/kg 体重) とラット NERP-2 (30 nmol/kg 体重) またはヒト GLP-1 (10 pmol/kg 体重) を投与し、投与後 40 分まで経時的に採血した。血中インスリン濃度を Rat Insulin EIA Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc.) を用いて測定した。

#### (5) 細胞内 Ca 濃度測定

MIN6 細胞培養株を HKRB バッファーで灌流し、灌流液を低グルコース溶液 (2.8 mM)、高グルコース溶液 (22 mM) に置換し、ラット NERP-2 (1 μM), NERP-2-Gly (1 μM, Peptide

Institute)、ヒト GLP-1 (10 nM) 添加後の細胞内 Ca 濃度の変化を Functional Imaging Cell-Sorting System (IMACS, Hamamatsu Photonics, 浜松) を用いて測定した。実験終了前に、陽性コントロールとしてトルブタミド (100 nM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いた。

#### (6) 統計解析

得られた結果は means ± SEM で表記した。統計解析は ANOVA、Fisher's LSD test、unpaired t-test、Bonferroni's post-test for multiple comparisons を用い、危険率 0.05 以下を有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### (1) NERPs はラ氏島に局在し膵 細胞内でインスリンと共存した

マウス膵ラ氏島に NERP-1 (図 1A) および NERP-2 (図 1B) 陽性細胞を認めた。vgf 遺伝子欠損マウスでは、NERP-1 および NERP-2 陽性細胞を認めなかった (図 1C、D)。膵ラ氏島に存在するインスリンと NERP-2 の二重免疫染色で、NERP-2 はインスリンと共存した (図 1E-G)。

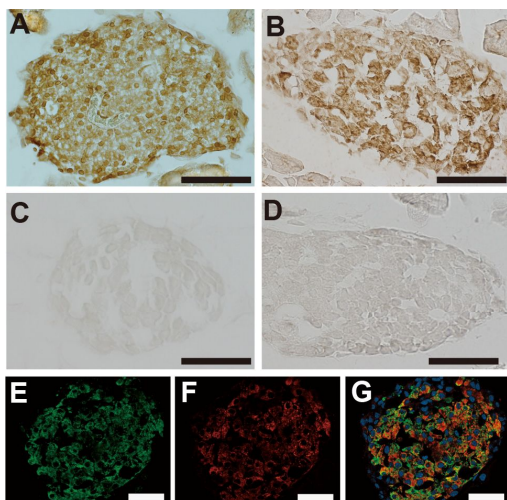


図1. NERP-1,-2のマウス膵ラ氏島での局在  
A. B. マウス膵ラ氏島での NERP-1 (A) と NERP-2 (B) の局在  
C. D. vgf 遺伝子欠損マウス膵ラ氏島での NERP-1 (C) と NERP-2 (D) の染色  
E. F. G. マウス膵ラ氏島でのインスリン (E, 緑) と NERP-2 (F, 赤) の二重免疫染色と (E) と (F) の merge 写真, Scale bars: 100 μm. (BBRC 428:512-517, 2012 を改変)

#### (2) NERP-2 は *in vitro* において高グルコース条件下でのインスリン分泌を促進した

5.5 mM の低グルコース培養液中で、NERP-1 および NERP-2 は MIN6 細胞からのインスリン分泌を促進しなかった。NERP-2 は高グルコース (22 mM glucose) 存在下でインスリン分泌を促進したが、NERP-1 や NERP-2 の非アミド体である NERP-2-Gly にはグルコース依存性インスリン分泌促進作用を認めなかった (図 2A)。マウス単離膵ラ氏島を用いた *in vitro* でのインスリン分泌実験においても MIN6 細胞と同様に高グルコース条件下でインスリン分泌を促進し、NERP-1 や NERP-2-Gly にはグルコース依存性インスリン分泌促進作用はなかった (図 2B)。NERP-2 によるインスリン分泌反応は用量依存的であり、最少有効濃度は  $10^{-7}$  M であった (図 2B)。

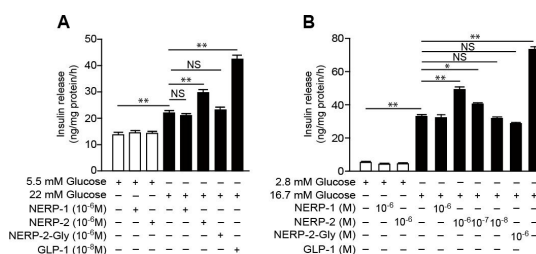


図2. NERP-2のインスリン分泌への影響  
A. MIN6細胞を用いたNERP-2のインスリン分泌活性。  
B. マウス単離膵ラ氏島を用いたNERP-2のインスリン分泌活性。  
\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, NS; not significant. (BBRC 428:512-517, 2012 を改変)

#### (3) NERP-2 は *in vivo* においてグルコース応答性インスリン分泌反応 (GSIS) を促進した

無麻酔・無拘束マウス腹腔内へのグルコースと NERP-2 の同時投与は、グルコース単独投与群に比べて血中インスリン濃度を有意に増加させた (図 3A)。NERP-2 投与後のインスリン AUC (血中インスリン濃度 - 時間曲線下面積、30 分間) は、GLP-1 投与群と同様にグルコース単独投与群よりも有意に増加した (図 3B)。麻酔下ラット静脈内へのグルコースと NERP-2 の同時投与は、マウス腹腔内へのグルコース・NERP-2 同時投与時と同様に、グルコース単独投与群に比べて血中インスリン濃度を有意に増加させた (図 3C)。麻酔下ラット静脈内へのグルコースと NERP-2 の同時投与後のインスリン AUC (30 分間) は、GLP-1 投与群と同様にグルコース単独投与群よりも有意に増加した (図 3D)。

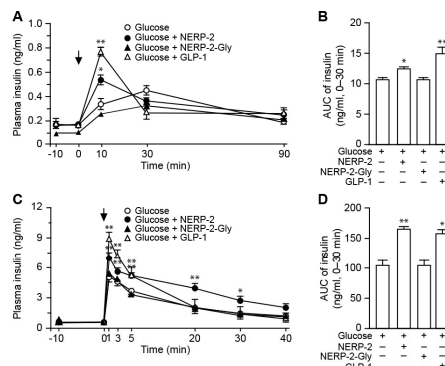


図3. NERP-2の*in vivo*でのグルコース応答性インスリン分泌促進活性  
A. 無麻酔マウス腹腔内へのNERP-2投与後のインスリンの動態。  
B. (A)の30分間のインスリン総分泌量 (AUC)。  
C. 麻酔下ラット静脈内へのNERP-2投与後のインスリンの動態。  
D. (C)の30分間のインスリン総分泌量 (AUC)。  
矢印は腹腔内 (A)、静脈内 (C) 投与を示す。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs ブドウ糖単独投与。(BBRC 428:512-517, 2012 を改変)

#### (4) NERP-2 は MIN6 細胞で細胞内 Ca 濃度を上昇させた

高グルコース (22 mM) 刺激は、細胞内 Ca 濃度を増加させ、陽性コントロールのトルブタミド添加後は著明に細胞内 Ca 濃度を増加させた (図 4A)。高グルコース培養液中への NERP-2 の添加は、高グルコース単独刺激群と比べて有意に細胞内 Ca 濃度を増加させた (図 4B)。NERP-2 の非アミド体である NERP-2-Gly は、細胞内 Ca 濃度増加反応を惹起しなかった (図 4C)。陽性コントロールである GLP-1 は、高グルコース存在下で、高グルコース単独刺激群と比べて有意に細胞内 Ca 濃度を増加させた (図 4D)。低グルコース

条件下では、MIN 6 細胞内の Ca 濃度に変化なかった (図 4 E)。NERP-2 と GLP-1 添加後の細胞内 Ca 濃度の AUC (細胞内 Ca 濃度 - 時間曲線下面積) は、高グルコース単独刺激群よりも有意に増加した (図 4 F)。

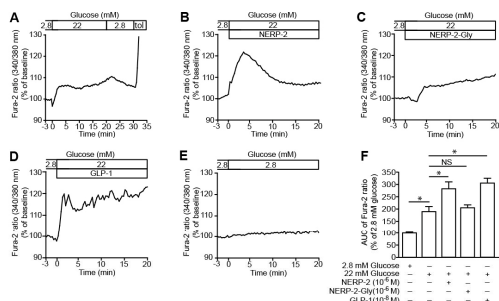


図4. MIN6細胞へのNERP-2添加後の細胞内Caの動態  
 A. 高グルコース (22 mM)、トルブタミド (tol)添加後のFura-2比の動態。  
 B. 高グルコース (22 mM) 存在下でのNERP-2添加後のFura-2比の動態。  
 C. 高グルコース (22 mM) 存在下での非アミド体NERP-2-Gly添加後のFura-2比の動態。  
 D. 高グルコース (22 mM) 存在下でのGLP-1添加後のFura-2比の動態。  
 E. 低グルコース (2.8 mM) でのFura-2比ベースラインの動態。  
 F. (A)から(E)の各種添加5分間のFura-2増加の総量 (AUC)。  
 \*P < 0.01, NS; not significant. (BBRC 428:512-517, 2012を改変)

### (5) 新規グラニン蛋白由来ペプチドの同定と今後の展開

NERP の前駆体タンパク VGF をコードする *vgf* 遺伝子は、神経成長因子 (NGF) を rat pheochromocytoma PC12 細胞に添加した際に誘導される遺伝子として同定された。617 個のアミノ酸からなる VGF タンパクは prohormone convertases により切断される塩基性アミノ酸配列を多数有し、種々の生理活性ペプチドの前駆体タンパクであると考えられていた。網羅的ペプチド解析法により同定された Neuroendocrine regulatory peptides (NERPs) は、中枢においてバゾプレシンの分泌制御や摂食・エネルギー代謝調節に機能する新たな生理活性ペプチドであることを明らかにした (J Biol Chem 282: 26354-26360, 2007, Am J Physiol Endocrinol Metab. 299, E394-401, 2010)。また、剖検や手術で得たヒト膵での NERP-1 と NERP-2 の含量はそれぞれ  $4.5 \pm 2.2$ 、 $1.0 \pm 0.3$  pmol/g であり、HPLC / RIA 法を用いた NERP 内在性分子型の検討で NERPs は成熟型で膵に存在することを明らかにした (Regul Pept, 163:43-48, 2010)。NERPs が膵組織に豊富に存在する知見を基に、本研究ではラットやマウスを用いて、NERPs の膵組織内局在、インスリン分泌に対する作用を検討した。NERPs はラ氏島に局在し、蛍光二重染色法にて NERPs はインスリンと多数共存していた。NERPs はグルカゴンと一部共存するも、ソマトスタチンとは共存しなかった。NERP-2 は高グルコース条件下で単離ラ氏島からのインスリン分泌を用量依存性に促進し、最小活性濃度は  $10^{-7}$ M であった。NERP-2 の非アミド体である NERP-2-Gly と NERP-1 はインスリン分泌促進活性を認めなかった。NERP-2 のマウス腹腔内投与は、グルコース誘発性インスリン分泌を促進した。MIN6 細胞株への NERP-2 添加で、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が高グルコース条件下で認めた (Biochem

Biophys Res Commun, 428:512-517, 2012)。以上の成績から、NERP-2 はインスリン分泌を制御する新たな生理活性ペプチドであることを本研究で明らかにした。

今後の課題として、NERP 受容体の同定はインスリン分泌促進作用を有する NERP-2 の膵細胞での情報伝達機構の解明に重要である。Orphan GPCR (G 蛋白共役型受容体) や各種イオンチャネルをスクリーニングし、NERP のターゲット分子を同定し、細胞内シグナル情報伝達機構を明らかにしたい。また、インスリン分泌促進作用を有する NERP-2 と現在糖尿病治療薬として上市されている GLP-1 アナログ製剤との併用療法を目指した臨床応用に向けたさらなる基盤研究を行う。さらに、新規 VGF 由来ペプチドである NERP-4 に関して現在インスリン分泌活性を検討している。グラニン由来ペプチドの網羅的機能解析で、インスリン分泌機構におけるグラニン蛋白の機能を解明したい。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Toshinai K, Saito T, Yamaguchi H, Sasaki K, Tsuchimochi W, Minamino N, Ueta Y, Nakazato M: Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 (NERPs) inhibit the excitability of magnocellular neurosecretory cells in the hypothalamus. Brain Res, in press (2014). 査読あり

Tsuchimochi W, Kyoraku I, Yamaguchi H, Toshinai K, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M: Ghrelin prevents the development of experimental diabetic neuropathy in rodents. Eur J Pharmacol, 702:187-193 (2013). 査読あり

Yamaguchi H, Moin AH, Rhee M, Kim JW, Toshinai K, Waiss TMZ, Naznin F, Matsuo T, Sasaki K, Minamino N, Yoon KH, Nakazato M: Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion in vivo and in vitro Biochem Biophys Res Commun, 428:512-517 (2012). 査読あり

Ogawa N, Ito M, Yamaguchi H, Shiuchi T, Okamoto S, Wakitani K, Minokoshi Y, Nakazato M: Intestinal fatty acid infusion modulates food preference as well as calorie intake via the vagal nerve and midbrain-hypothalamic neural pathways in rats. Metabolism, 61: 1312-1320 (2012). 査読あり

Koshinaka K, Toshinai K, Mohammad A, Noma K, Oshikawa M, Ueno H, Yamaguchi H, Nakazato M: Therapeutic potential of ghrelin treatment for unloading-induced muscle atrophy in mice. Biochem Biophys Res Commun, 412 296-301 (2011). 査読あり

〔学会発表〕(計 14 件)

土枝内 厚次、齋藤 健、山口 秀樹、佐々木 一樹、南野 直人、上田 陽一、中里 雅光：NERP-1 と NERP-2 のバソプレシン分泌調節機能の解析。第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2013 年 11 月 22 日～23 日、大阪

モイン・アブサレーエムディ、土枝内 厚次、山口 秀樹、佐々木 一樹、南野 直人、中里 雅光：Functional analyses of Neuroendocrine regulatory peptide-2 (NERP-2) in regulating glucose stimulated insulin secretion in vitro and in vivo。第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2013 年 11 月 22 日～23 日、大阪

土枝内 厚次、山口 秀樹、佐々木 一樹、影山 晴秋、塩田 清二、南野 直人、中里 雅光：NERP-2 のオレキシン系を介したエネルギー代謝調節。第 40 回日本神経内分泌学会、2013 年 10 月 25 日(金)26 日(土)、宮崎

山口 秀樹、モイン・アブサレーエムディ、松尾 崇、土枝内 厚次、佐々木 一樹、南野 直人、中里 雅光：新規生理活性ペプチド NERP の膵細胞での機能解析。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16 日(木)～18 日(土)、熊本

モイン・アブサレーエムディ、山口 秀樹、土枝内 厚次、佐々木 一樹、南野 直人、中里 雅光：Neuroendocrine regulatory peptide-2 (NERP-2) is a novel regulator of glucose stimulated insulin secretion in rodents。第 86 回日本内分泌学会学術集会、2013 年 4 月 25 日(木)～27 日(土)、仙台

松尾 崇、山口 秀樹、モイン・アブサレー、土枝内 厚次、影山 晴秋、佐々木 一樹、南野 直人、塩田 清二、中里 雅光：新規生理活性ペプチド NERP-2 の局在と機能。第 39 回日本神経内分泌学会学術集会、2012 年 9 月 29 日、30 日、北九州

Yamaguchi H, Toshinai K, Matsuo T, Kageyama H, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M: Neuroendocrine regulatory peptides (NERPs) in regulating feeding and hormone secretions。第 3 回国際神経ペプチド学会日本支部主催 国際シンポジウム The 3rd Japan INPS Meeting、2012 年 9 月 29 日(土)1～9 月 30 日(日)、北九州

Abu Saleh Md. Moin, 山口 秀樹、松尾 崇、土枝内 厚次、佐々木 一樹、南野 直人、中里 雅光：Neuroendocrine regulatory peptide-2 (NERP-2) is a novel regulator of glucose-stimulated insulin secretion in rodents。第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日(木)～21 日(土)、名古屋

松尾 崇、山口 秀樹、土枝内 厚次、影山 晴秋、佐々木 一樹、南野 直人、塩田 清二、中里 雅光：新規生理活性ペプチド NERP-2 のマウス膵での局在。第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日(木)～21 日(土)、名古屋

土枝内 厚次、齋藤 健、山口 秀樹、佐々木 一樹、南野 直人、上田 陽一、中里 雅光：NERPs によるバソプレシン分泌調節機序の解析。第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 19 日(木)～21 日(土)、名古屋

松尾 崇、山口 秀樹、影山 晴秋、佐々木 一樹、塩田 清二、南野 直人、中里 雅光：新規生理活性ペプチド Neuroendocrine regulatory peptides (NERPs) のヒト組織での局在。第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011 年 4 月 21 日から 23 日、神戸

NERP-2 の摂食およびエネルギー代謝調節作用、土枝内 厚次、山口 秀樹、影山 晴秋、松尾 崇、佐々木 一樹、塩田 清二、南野 直人、中里 雅光、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011 年 4 月 21 日から 23 日、神戸

Yamaguchi H, Matsuo T, Kageyama H, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M: Neuroendocrine regulatory peptides (NERPs) localize in human neurons and endocrine tissues。93rd Annual Meeting of the Endocrine Society, 4-7 Jun 2011, Boston, USA

Matsuo T, Toshinai K, Kageyama H, Yamaguchi H, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M: Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus。93rd Annual Meeting of the Endocrine Society, 4-7 Jun 2011, Boston, USA

〔図書〕(計 3 件)

山口 秀樹、鮫島 浩、中里 雅光：下垂体炎、尿崩症 産科と婦人科 80 巻増刊号 ホルモン療法実践マニュアル 診断と治療社 99-103 (2013)。

山口 秀樹、上野 浩晶、中里 雅光：グレリンとオベスタチン、内分泌・糖尿病・代謝内科、36 巻、科学評論社 287-292 (2013)。

山口 秀樹、中里 雅光：実験医学増刊 代謝・内分泌 ネットワークと医薬応用 生理活性ペプチドと疾患・臨床応用 752-758, 2011

児島将康、齋藤祐見子、中里雅光編、羊土社 (東京)。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 秀樹 (YAMAGUCHI Hideki)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10305097

(2)研究分担者

十枝内 厚次 (TOSHINAI Koji)

宫崎大学・医学部・講師

研究者番号： 80381101