

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462733

研究課題名(和文) 涙腺における局所ステロイド産生とその生理的役割の解明

研究課題名(英文) Locally-produced steroid hormones regulate lacrimal gland function.

研究代表者

樋口 明弘 (Higuchi, Akihiro)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：20383755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：涙腺にはステロイド合成系が発現しており、数種類のステロイドホルモンが合成されている。本研究では、涙腺における局所ステロイド合成酵素の発現解析を行い、局所ステロイドホルモンの涙腺における生理的役割を検討する。

ドライアイモデルラットの涙腺中ステロイド合成酵素の活性を測定したところ、シトクロムP45017 活性の上昇が確認できた。この活性上昇はP45017 およびシトクロムb5発現の上昇によるものであった。ドライアイモデルでは涙腺中ジヒドロテストステロン濃度が上昇しており、この変動はP45017 活性上昇に起因すると考えられた。涙腺機能は局所ステロイドホルモンによる調節を受けていると思われる。

研究成果の概要(英文)：The lacrimal gland function was affected by steroid hormones. According to the classical theories of endocrinology, steroid hormones are synthesized in specific organs and affect the target tissues. Recent studies showed that locally-synthesized steroid hormones acted on neighboring tissues including themselves in the hippocampus, islets of Langerhans, and musculus skeletal. Expression of steroidogenic enzymes was elucidated by real-time RT-PCR and Immunohistochemical analysis. Activity of steroidogenic enzymes was assayed using LC-MS/MS. In dry eye model rat, the activity of cytochrome P45017 increased accompanied with increase of expressions of P45017 and cytochrome b5 compared with normal rat. LC-MS/MS analysis revealed that dihydrotestosterone (DHT) in lacrimal glands increased in dry eye model rat. Increase of DHT was thought to be caused by increase of P45017 activity. It was considered that the function of lacrimal gland was regulated by locally-produced steroid hormones.

研究分野：眼生化学

キーワード：ステロイドホルモン 局所合成ステロイド 涙腺 シトクロムP450 喫煙

1. 研究開始当初の背景

ステロイドは生物界に広く存在し、様々な機能を果たしている。特に哺乳類ではステロイドホルモンとして様々な生理作用を持つことが知られている。ステロイドホルモンは様々な酵素による触媒反応によりコレステロールより産生されている(図1)。

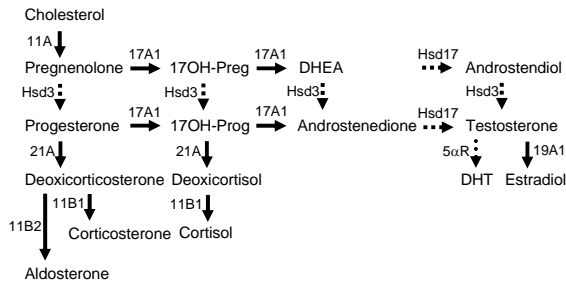


図1. ステロイドホルモン合成経路

11A: P450_{scc}, 17A1: P450₁₇, 21A: P450_{c21}, 11B1: P450₁₁, 11B2: P450_{ald}, 19A1: P450_{arom}, Hsd3: 3 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 β -HSD), Hsd17: 17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(17 β -HSD), 5 α R: 5 α -還元酵素, DHEA: デヒドロエピアンドロステロン, DHT: 5 α -ジヒドロテストステロン

ステロイドホルモンは生殖腺や副腎などの産生器官で作られ、血液を介して標的組織に運ばれ、作用すると考えられていたが、近來、脳、膵臓、筋肉、心血管系など、生殖腺のような古典的産生組織以外でステロイドホルモンが産生され、それ自身あるいはその周辺組織に作用していることが報告されている。これらのステロイドホルモンは、局所ステロイドホルモンと呼ばれている。

2. 研究の目的

ドライアイは様々な要因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患である。眼不快感や視機能異常を伴い、涙液分泌量の低下や眼球表面からの涙液蒸散量上昇によって生じる。ドライアイは女性、特に更年期以降の女性に多い疾患であることが知られている。また、涙腺ではアンドロゲンおよびエストロゲン受容体の発現が確認されており、これらのことは涙腺機能が性ホルモンの影響を受けていることを示す。しかしながら、エストロゲンやアンドロゲンの全身投与はドライアイ治療に有効ではない。

ラット涙腺を用いた免疫組織染色法およびリアルタイム RT-PCR 法による予備検討の結果、涙腺には性ホルモン受容体だけでなく、各種ステロイド合成酵素の発現が確認された。このことは涙腺において局所ステロイドホルモンの合成が行われていることを示唆する。

本研究では、(1) 涙腺における局所ステロイド合成活性測定法の確立、(2) *In vitro* における涙腺組織による涙液産生能測定系

の確立および産生に対するステロイドの影響の検討、(3) ドライアイモデルにおけるステロイド産生の検討、を実施し、局所ステロイドホルモンの涙腺における生理的役割の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 涙腺における局所ステロイド合成活性測定法の確立

ステロイド合成酵素の活性測定には、アイソトープラベルされたステロイド基質を用いることが一般的であるが、LC-MS/MS法の発展により、非ラベル化基質を用いることが可能となってきた。アイソトープを用いないために扱いが容易であるが、既知ではない生成物の同定が困難であるという欠点がある。全身性のステロイドを合成する生殖腺などでは、主要反応が高活性であるため副生成物が生成されにくい、局所ステロイド合成組織では相対的に主要反応の活性が低く、プロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾール、テストステロンなどの主要ステロイド以外のステロイドが容易に生成される。そのため、目的の反応以外の反応を阻害する必要があるが、局所ステロイド合成組織ではすべてのステロイド代謝反応が確認されているわけではない。

涙腺には5 α -還元酵素が発現している。この酵素はテストステロンをアンドロゲン活性の高いジヒドロテストステロン(DHT)に変換するが、プロゲステロンなど多くのステロイドを代謝するため、阻害剤としてフィナステリドを用いることにした。

ミトコンドリア、ミクロソームの調製

日本クレア株式会社より、7~9週齢雄 Sprague-Dawley (SD) ラットを購入した。麻酔下にてラットより涙腺を摘出し、細胞分画法を用いて、ミトコンドリア画分およびミクロソーム画分を単離した。

ミクロソームの酵素活性測定

プロゲステロンを基質として、ミクロソームのP450₁₇ およびP450_{c21} 活性を測定した。試験管中に 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.3), 0.1mM プロゲステロン, 0.1mg/mL ミクロソーム, 10 μ M フィナステリドを加え、0.1mM NADPH を添加して反応を開始した。反応液は 1mL とした。37 $^{\circ}$ C で 10~30 分間インキュベート後、試験管を氷中に入れ反応を停止した。停止後速やかに液体窒素を用いて凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

アセトニトリル-ギ酸水溶液を用いてステロイドを抽出し、メタノールおよびカラムを用いた前処理後、LC-MS/MS法によってステロイド生成物を定量した。

同様の方法を用いて、プレゲネロン、テストステロンを基質として、ミクロソーム画分の 3 β -HSD、17 β -HSD 活性を測定した。3 β -HSD 活性測定時には補酵素として NAD⁺を用いた。

ミトコンドリアの酵素活性測定

マイクロソーム画分の活性測定と同様の方法でミトコンドリア画分の P45011 活性を測定した。0.1mM デオキシコルチコステロンを基質とし、0.5mg/mL ミトコンドリア、1 μ M アドレノドキシン還元酵素、10 μ M アドレノドキシン、10 μ M フィナステリドを含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.3) 1mL に 0.1mMNADPH を添加し、37 $^{\circ}$ C で 10~30 分間反応を行った。反応後ステロイドを抽出し、LC-MS/MS 法を用いて生成物を定量した。

(2) In vitro における涙腺組織による涙液産生能測定系の確立および産生に対するステロイドの影響の検討

涙液産生能のマーカーとして涙液中主要タンパク質であるリゾチームを用いることにした。リゾチームは活性測定で定量できるため、勘弁に測定できる。

ラットより涙腺を摘出し、クリーンベンチ内でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて洗浄後、メスで切断した。切断した涙腺を PBS に入れ、室温で 1~2 時間インキュベーションし、インキュベーション後 PBS を回収した。また、PBS の代わりにダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて、37 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベーションし、培地を回収した。回収した PBS あるいは DMEM 中のリゾチーム濃度を測定した。

(3) ドライアイモデルにおけるステロイド産生の検討

涙腺中ステロイド濃度の測定

日本クレアより 6~8 週齢雄 SD ラットを購入し、1 週間馴化した。麻酔下にて精巣を切除し、2 週間の飼育により、血中アンドロゲン、濃度を低下させた。

血液および涙腺を回収し、アセトニトリル-ギ酸水溶液を用いてステロイドを抽出し、メタノールおよびカラムを用いた前処理後、LC-MS/MS 法を用いてステロイドを定量した。

ドライアイモデルにおけるステロイド産生

喫煙および受動喫煙はドライアイの増悪因子であることが知られている。タバコ主流煙 (TS) に対してラットを全身曝露させることによりドライアイを発症させることができる (Higuchi A. et al. Free Radic Biol Med. 2011;51:2210-2216)。このドライアイモデルを用いて実験を行った。

日本クレアより 6~8 週齢雄 SD ラットを購入し、1 週間馴化した。実験的に作成した TS 曝露チャンバー内にラットを 12 匹入れた。シリンジに主流煙を吸入し (セブンスター) チャンバー内に 300mL を投与した。30 分後、同様に 300mL の TS を投与し、全部で 6 回、1 日あたり 3 時間の曝露を行った。1 あるいは 2 週間の曝露により涙液量低下および角膜障害が生じる。曝露処理後、綿糸を用いて涙液量を測定し、正常群と比較して低下していることを確認した。

正常および曝露処理ラットより涙腺を摘出し、一部は酵素活性測定のためにマイクロソームおよびミトコンドリア調製に用いた。一部は遺伝子発現解析のために使用した。

TRIzol を用いて涙腺より RNA を抽出した。逆転写後、TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法により発現量を測定した。内部標準として GAPDH を使い、Ct 法により発現変動解析を行った。使用した試薬および方法は、サーモフィッシャーサイエンティフィックの推奨するものを用いた。

4. 研究成果

(1) 涙腺における局所ステロイド合成活性測定法の確立

図 2A-D に活性測定の結果を示した。横軸は反応時間、縦軸は生成物量を示している。各結果は平均値 \pm SD 値 (n=4) を示している。図 2A はプロゲステロンを基質として、17-ヒドロキシプロゲステロン (17OHP)、アンドロステンジオン、デオキシコルチコステロン (DOC) の生成を測定している。涙腺マイクロソームに P45017 および c21 活性が存在することが示されている。

図 2B はプレゲネロンを基質として、17-ヒドロキシプレゲネロンおよびプロゲステロンの生成を測定している。P45017 および 3 β HSD 活性の存在が示されている。

図 2C はアンドロステンジオンを基質として、テストステロンの生成を測定している。涙腺マイクロソームにおける 17 β HSD 活性の存在が示されている。

図 2D はミトコンドリアにおける P45011 活性を調べた結果である。基質として DOC を使い、コルチコステロンの生成を測定している。

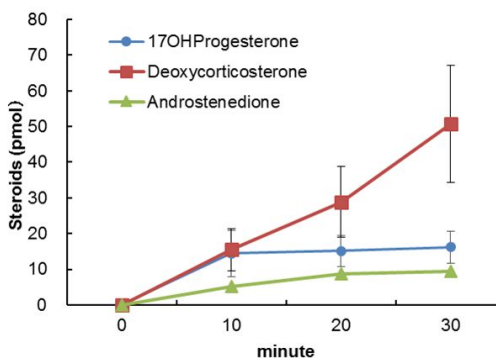


図 2A. プロゲステロン代謝

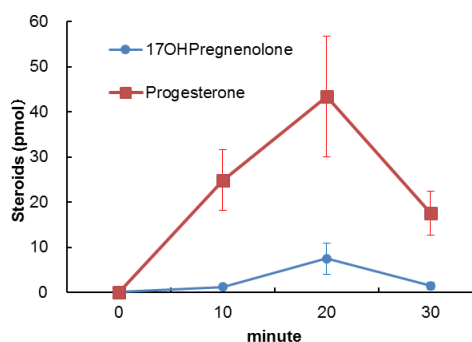


図 2B. プレグネノロン代謝

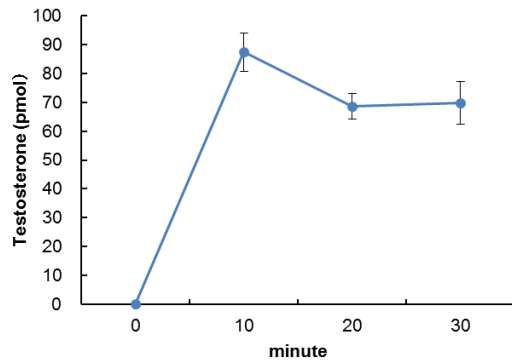


図 2C. アンドロステンジオン代謝

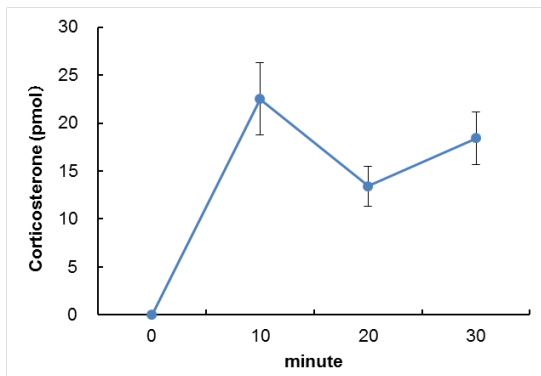


図 2D. デオキシコルチコステロン代謝

以上の結果から、リアルタイム RT-PCR および免疫組織染色法で発現が確認されていたステロイド合成酵素が、活性を有していることが明らかにされた。涙腺組織においても実際にステロイドが合成されていると考えられる。

ステロイド生成量は、図 2A の DOC 以外時間の経過とともに増大するのではなく、横ばいあるいは減少傾向が観察された。このことは、産生されたステロイド、例えば、17OHP、アンドロステンジオン、コルチコステロンが他の酵素により代謝されていることを示唆している。涙腺にはステロイド代謝、分解酵素が多数発現していると考えられるため、5 還元酵素を阻害しただけでは生成物の分解を防ぐことはできない。涙腺におけるステロイド合成酵素の正確な比活性を算定するための、今後の課題となると思われる。

プロゲステロンを基質としたときにはアンドロステンジオンが検出されたにもかかわらず、プレグネノロンを基質としたときにデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) は検出されなかった (図 2B)。この原因は 4 系ステロイドに対して 5 系ステロイドの検出感度が低いためである可能性がある。ステロイド分子種による検出感度の差は、定量性確保のための課題である。

プロゲステロンを基質としたときに、1 段階の酵素反応で生成する 17OHP、DOC 以外に、2 段階反応で生成するアンドロステンジオン

が検出されたが、同じく 2 段階反応で生成されるデオキシコルチゾールは検出されなかった (図 2A)。アンドロステンジオンが産生される時は中間体である 17OHP は P45017 から乖離せず、引き続き代謝されてアンドロステンジオンに変換されると考えられる。

(2) In vitro における涙腺組織による涙液産生能測定系の確立および産生に対するステロイドの影響の検討

1 時間あるいは 18 時間インキュベーションどちらにおいてもリゾチーム量のばらつきが大きく、定量することが困難であった。涙腺の切断方法、洗浄方法などを改良したが、ばらつきの改善は認められなかった。リゾチーム酵素活性失活の影響も考えられるため、マーカーとしてラクトフェリンを用いることにした。ラクトフェリン定量のためにサンドイッチ EIA 系を構築した。今後はラクトフェリンをマーカーとして涙液産生能の測定を行う。

(3) ドライアイモデルにおけるステロイド産生の検討

涙腺中ステロイド濃度の測定

性腺除去によって血清中アンドロゲン濃度を低下させると、涙腺中アンドロゲン濃度は低下したが、完全に消失することなく、血清中よりも高い濃度で存在した。このことは血清に由来しないアンドロゲンが涙腺中に存在すること、すなわち涙腺においてアンドロゲンが生合成されていることを示している (表 1)。

		アンドロステンジオン	テストステロン	DHT
血清	性腺除去	5.2 ± 4.3	1.9 ± 0.5	1.5 ± 1.4
涙腺	正常	64.7 ± 34.9	1641 ± 283	4111 ± 306
	性腺除去	5.7 ± 1.2	11.4 ± 1.3	55.4 ± 27.1

表 1. 涙腺中アンドロゲン濃度 ((ng/mL))

涙腺には P450c21 などコルチコイド合成に関与する酵素も発現している。そのため今後の課題として、アンドロゲン以外のステロイドの涙腺中濃度を調べていく必要がある。副腎由来のステロイドの影響をなくすために、副腎あるいは副腎および精巣を切除したラットを用いて、涙腺中ステロイド濃度の測定を行う予定である。

ドライアイモデルにおけるステロイド産生

1、2 週間の TS 曝露処理により、涙液量は有意に低下した (図 3)。正常涙腺の遺伝子発現を TS 曝露処理群と比較すると、P45017 およびシトクロム b5 (Cyp5) の発現が上昇し、3 HSD 発現が低下していることがわかった (表 2)。そこで、P45017 および 3 HSD 活性を正常群と TS 曝露群間で比較検討した。P450c21 の活性は差がほとんどなかったが、45017 活性は 3.4 倍に増大し、3 HSD 活性

は0.8倍に低下しており、遺伝子発現解析の結果と同様の傾向を示した(表3)。TS曝露の涙腺中ステロイド濃度に対する影響を検討したところ、プロゲステロンおよびテストステロン濃度については変動が認められなかったが、DHEA濃度は低下し、DHT濃度は上昇した(表4)。

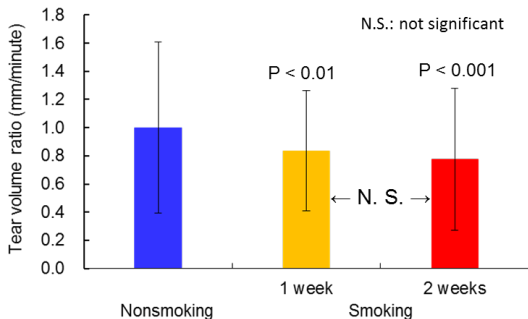


図3. 涙液量に対するTS曝露の影響

		P450scc	P45017α	P450c21	P45011β	Cyb5	3βHSD
Nonsmoking	ΔCt	14.02	16.30	12.70	19.54	1.73	13.17
	FC	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Smoking 1w	ΔCt	13.43	15.09	12.66	19.38	1.06	13.72
	FC	1.51	2.31	1.03	1.12	1.59	0.68
Smoking 2w	ΔCt	14.07	15.46	12.75	19.55	1.23	13.52
	FC	0.97	1.79	0.97	0.99	1.41	0.78

Ct(GAPDH) = 22.3 FC: Fold change

表2. TS曝露の涙腺遺伝子発現に対する影響
赤は増大、青は減少を意味している。

	Specific activity (pmol/hour/mg protein)		
	Nonsmoking	Smoking	Ratio (S/N)
3βHSD	14.9 ± 1.7	11.4 ± 1.5	0.8
P45017α	17.4 ± 3.9	26.8 ± 3.4	3.4
P450c21	207.6 ± 25.9	193.8 ± 32.7	0.9

表3. TS曝露の涙腺ステロイド合成酵素活性に対する影響

nM	Nonsmoking	Smoking
Progesterone	1.50 ± 0.63	1.30 ± 0.08
DHEA	50.6 ± 24.3	21.3
Androstenedione	ND	0.92
Testosterone	13.7 ± 2.6	12.1 ± 1.9
DHT	30.4 ± 3.3	50.1 ± 11.4

表4. TS曝露の涙腺中ステロイド濃度に対する影響

TS曝露により涙腺ステロイド合成酵素活性は変動した。この変動はmRNA発現の変動を伴うものであり、涙腺ステロイド合成酵素活性が遺伝子発現レベルにおいて調節されていることが示唆された。TS曝露によりCyb5発現量が増大した。P450に対する電子供与はP450還元酵素以外にCyb5も行っている。Cyb5発現の上昇はP450に対する電子供与量を増大させ、結果としてP450酵素活性を上昇させる。P45017活性の上昇にはCyb5発現量の増大も関与していると思われる。

3 HSD活性の低下とP45017活性の上昇

により、ステロイド合成経路は5経路優位となり、コルチコイドの産生が低下し、アンドロゲン産生が上昇すると考えられる。涙腺中ステロイドは、TS曝露により最終産物であるDHTが増大しており、酵素活性変動の影響を受けていると思われる。

涙液産生分泌における涙腺アンドロゲンの役割は不明であり、その解明は今後の大きな課題である。また、DHT、テストステロン、コルチコステロンなどの典型的ステロイド以外にも涙腺では産生されていることから、これらの非典型的ステロイドの生理的意義も明らかにしていかなければならない。これらの涙腺における局所ステロイドの生理的役割を明らかにすることは、ドライアイ治療薬の開発に有用である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計18件)

1. Higuchi A, Oonishi E, Kawakita T, Tsubota K. Evaluation of Treatment for Dry Eye by 2-Hydroxyestradiol using Dry Eye Rat Model. *Mol Vis.* 2016;22:116-53. <http://www.molvis.org/molvis/v22/446/> 査読有

2. Nishimoto K, Seki T, Kurihara I, Yokota K, Omura M, Nishikawa T, Shibata H, Kosaka T, Oya M, Suematsu M, Mukai K. Nodule development from subcapsular aldosterone-producing cell clusters causes hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:6-9. doi: 10.1210/jc.2015-3285. 査読有.

3. 樋口明弘. ドライアイモデル動物における酸化ストレス. *Frontiers in Dry Eye.* 2015;10:16-21. http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0042_1002. 査読無

4. Kojima T, Dogru M, Higuchi A, Nagata T, Ibrahim OM, Inaba T, Tsubota K. The effect of Nrf2 knockout on ocular surface protection from acute tobacco smoke exposure: evidence from Nrf2 knockout mice. *Am J Pathol.* 2015;185:776-85. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.014. 査読有

5. Volpe C, Hamberger B, Hoog A, Mukai K, Calissendorff J, Wahrenberg H, Zedenius J, Thoren M. Primary aldosteronism: functional histopathology and long-term follow-up after unilateral adrenalectomy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;82:639-647. doi: 10.1111/cen.12645. 査読有.

6. Ishihara Y, Takemoto T, Ishida A, Yamazaki T. Protective actions of 17-estradiol and progesterone on

oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds. 2015;343706: 1-16. doi:10.1155/2015/343706. 査読有.

7. Ishihara Y, Itoh K, Ishida A, Yamazaki T. Selective estrogen-receptor modulators suppress microglial activation and neuronal cell death via an estrogen receptor-dependent pathway. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015;145:85-93. 10.1016/j.jsbmb.2014.10.002. 査読有.

8. Sawazaki R, Ishihara T, Usui S, Hayashi E, Tahara K, Hoshino T, Higuchi A, Nakamura S, Tsubota K, Mizushima T. Diclofenac protects cultured human corneal epithelial cells against hyperosmolarity and ameliorates corneal surface damage in a rat model of dry eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55:2547-56. doi: 10.1167/iovs.13-13850. 査読有.

9. Dekkers T, ter Meer M, Lenders JWM, Hermus ARM, Schultze L, Kool L, Langenhuijsen JF, Nishimoto K, Ogishima T, Mukai K, Azizan, EAB, Tops B, Deinum J, Küsters B. Adrenal nodularity and somatic mutations in primary aldosteronism: one node is the culprit? J Clin Endocrinol Metab. 2014;99: E1431-E1451. doi: 10.1210/jc.2013-4255. 査読有.

10. Munetsuna E, Hattori M, Yamazaki T. Stimulation of estradiol biosynthesis by tributyltin in rat hippocampal slices. Endocr Res. 2014;39:168-172. doi: 10.3109/07435800.2013.875563. 査読有.

11. Yamazaki T, Yamamoto M, Ishihara Y, Onizaki M, Komatsu S, Munetsuna E, Ishida A, Kawato S, Mukuda T. De novo synthesized estradiol protects against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal slices. Pros One. 2013;8:e55559. doi: 10.1038/hr.2013.63. 査読有.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 樋口明弘、山崎岳、向井邦晃、荻島正、前田尚之、横田博、坪田一男、涙腺における局所ステロイドの生理機能、第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 4 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)。

2. 向井邦晃、荻島正、樋口明弘、西本紘嗣郎、ヒト副腎皮質の構成的アルドステロン産生細胞クラスターに生じる体細胞変異の解析、涙腺における局所ステロイドの生理機能、第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 4 日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)。

3. Yamazaki T, Ishihara Y. De novo synthesis of neuroprotective steroids. 19th International Conference on Cytochrome P450、2015 年 6 月 12 日、国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都渋谷区)。

4. 樋口明弘、山崎岳、向井邦晃、荻島正、前田尚之、横田博、坪田一男、涙腺における局所ステロイドの生理機能、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館(京都府京都市)。

5. 樋口明弘、山崎岳、三谷英美子、向井邦晃、荻島正、川北哲也、坪田一男、涙腺における局所ステロイドホルモンの生理機能、角膜カンファランス 2014 大会、2014 年 1 月 30 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)。

6. 樋口明弘、山崎岳、三谷英美子、向井邦晃、荻島正、坪田一男、涙腺における局所ステロイドの生理機能、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

7. 向井邦晃、西本 紘嗣郎 ヒト副腎皮質における誘導的および構成的アルドステロン産生、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

8. 山崎 岳、石原康宏、富士谷法子 ニューロステロイドによる神経保護作用 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

〔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〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 明弘 (HIGUCHI, Akihiro)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号: 20383755

(2) 研究分担者

山崎 岳 (YAMAZAKI, Takeshi)
広島大学・総合科学研究科・教授
研究者番号: 30192397

向井 邦晃 (MUKAI, Kuniaki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 80229913