

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640107

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスを利用した特異性の高いヒト細胞ゲノム編集技術の開発

研究課題名(英文) Development of a highly specific genome editing technology for human cells using adeno-associated viral vector

研究代表者

小西 裕之(Hiroyuki, Konishi)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：20344335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アデノ随伴ウイルス(AAV)ターゲティングベクターによる遺伝子改変の効率向上を目指して研究を行った。その結果、ベクター内の選択マーカー遺伝子をどのプロモーターの下流で制御するかによって遺伝子改変効率が変わり、CMVプロモーターのような転写活性の強いプロモーターを使用するとむしろ効率が低下することがわかった。また、プロモーターを持たず、標的となる内在性遺伝子のプロモーターの下流で選択マーカーを制御する(つまりプロモータートラップ式の)AAVターゲティングベクターは、従来の内在性リボソーム進入部位(IRES)の代わりに2A配列を用いることによって遺伝子改変効率が向上することがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to improve the efficiency of gene targeting mediated by adeno-associated viral (AAV) vectors. We found that the efficiency of gene targeting achieved by AAV-based targeting vectors varies depending on the choice of promoters regulating a selection marker gene within the vectors, and that the use of promoters exhibiting strong transcriptional activity, such as the CMV promoter, in AAV targeting vectors does not result in gene targeting with high efficiency. This study also revealed that a higher gene targeting efficiency is achieved by using a 2A peptide, rather than a commonly used internal ribosomal entry site (IRES), within AAV-based targeting vectors which carry no promoter and exploit the promoters of targeted endogenous genes to regulate a selection marker gene within the vectors (i.e., promoter-trap targeting vectors).

研究分野：分子生物学・遺伝子工学

キーワード：アデノ随伴ウイルスベクター 遺伝子改変 CRISPR-Cas9 ゲノム編集 2A

1. 研究開始当初の背景

アデノ随伴ウイルス (AAV) の骨格を利用したターゲティングベクターは、高効率な遺伝子改変を実現するツールとして以前から注目されていた。同ベクターは、宿主細胞のゲノムにランダムに挿入されることは少なく、逆に DNA 相同組換えを誘導する効率は古典的なプラスミド製ターゲティングベクターの 1,000 倍前後に達する¹⁾。そのため、マウス ES 細胞などに比べ相同組換え効率の低いヒト細胞株の遺伝子改変において特に重用されてきた。当研究グループも、同ベクターを用いて複数のヒト非癌上皮細胞株の癌関連遺伝子を改変し、遺伝子機能解析に役立ててきた^{2), 3)}。

さらに、AAV は基本的にヒトに対する病原性がない上、ベクター化の際にウイルス遺伝子がすべて除去されており、ウイルス由来のタンパク質が産生される恐れはない。また、相同組換えの過程でウイルス由来の塩基配列は一切ゲノムに組み込まれないため、AAV ターゲティングベクターの人体に対する安全性は高いとされる。そのため、同ベクターの生体内投与による *in vivo* での遺伝子改変を視野に入れた研究も行われてきた⁴⁾。

ゲノム編集法が誕生した現在でも、AAV ターゲティングベクターによる遺伝子改変は同法を補完しうる有用な技術と考えられる。そこで当研究グループや他のグループは、AAV ターゲティングベクターによる遺伝子改変のさらなる効率化を目指し研究を行ってきた^{5), 6)}。しかし、現段階ではその遺伝子改変効率は十分ではなく、改変の適応となる細胞の種類も限られるのが実情である。今後、同ベクターを利用して多種類のヒト細胞のゲノムを自在に改変できるようになるためには、より一層の遺伝子改変効率の改善が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、当研究グループのこれまでの経験を活かし、AAV ターゲティングベクターによる遺伝子改変の技術的改良を行う。現行のベクターを出発点としてその構成要素を見直し、ベクターを再構築する。AAV ターゲティングベクターの長所である遺伝子改変の特異性と安全性を担保しつつ、遺伝子改変効率を飛躍的に高める。究極的には、ゲノム編集法と同レベルの高い遺伝子改変効率と遺伝子改変の特異性・安全性とを両立する技術の開発を目指す。本研究の成果から生み出される新しい遺伝子改変技術によって、将来的に多数の遺伝子改変ヒト細胞株が作成され、各種疾患の基礎研究の進展や治療法開発に貢献することを期待する。

3. 研究の方法

(1) AAV ターゲティングベクターに搭載するプロモーターの検討

各プロモーターの転写活性の検討

合計 6 種類のプロモーター (*hACTB*, *hEF1*、CAG、CMV、SV40、HSV-TK のプロモーター) の AAV ベクター内における転写活性を評価した。まず、EGFP 遺伝子の 5' 側に各プロモーターを連結し、ネオマイシン耐性遺伝子の発現カセットを持つ AAV ベクター内に設置した。構築した AAV ベクターを 4 種類のヒト細胞株 (HCT116、DLD-1、HT-1080、MCF-10A) に導入し、プロモーター活性の評価を行った。

プロモーター活性は、FACSCanto II (BD Biosciences) を使用し、フローサイトメトリーによって評価した。導入後早期におけるプロモーター活性は、AAV ベクター導入の 2 日後に GFP シグナル陽性の細胞における平均シグナル強度を決定することによって評価した。長期的なプロモーター活性は、AAV ベクターを導入した細胞を G418 選択下で維持培養し、2 週間ごとに 8 週間の間、細胞が発する蛍光シグナルの平均強度を決定することによって評価した。また、各プロモーターを AAV ベクター内でネオマイシン耐性遺伝子の 5' 側に設置し、HCT116、DLD-1、HT-1080 細胞株に導入した後、G418 選択を行い、形成されるコロニーの個数を数えた。得られた結果を前述の GFP シグナルに基づく長期的プロモーター活性と比較した。

各プロモーターを搭載した AAV ターゲティングベクターの遺伝子改変効率の検討

さらに、6 種類それぞれのプロモーターの下流で薬剤耐性遺伝子が制御される AAV ターゲティングベクターを作成し、それらの遺伝子改変効率を評価した。遺伝子改変効率は、*PIGA* 遺伝子をレポーターとするアッセイ系⁷⁾ ならびに *Hyg^R-5'* EGFP 融合遺伝子をレポーターとするアッセイ系⁸⁾ によって定量した。

PIGA 遺伝子をレポーターとするアッセイ系は、同遺伝子が GPI アンカー生合成に必須であり、その改変による不活化が細胞表面からの GPI アンカーの喪失を誘導することを利用したものである。本研究では、*PIGA* 遺伝子に異所性終止コドンを導入するターゲティングベクターを作成し、細胞株に導入した後、GPI アンカーに対する蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで蛍光陰性細胞の割合を測定した。なお、このアッセイは、男性細胞が X 染色体上に位置する *PIGA* 遺伝子を 1 アレルしか所持しないことを利用している。本研究では男性由来の HCT116、DLD-1、HT-1080 細胞株を使用した。

一方、*Hyg^R-5'* EGFP 遺伝子 (ハイグロマイシン耐性遺伝子と EGFP の 5' 側 3 分の 2 との融合遺伝子) をレポーターとするアッセイ系

では、あらかじめ同融合遺伝子を外来性に DLD-1 細胞株のゲノムに安定導入しておき、相同組換えのレポーターとして使用した。開始コドンに欠失した EGFP 遺伝子を含むターゲットベクターをレポーター細胞に導入すると、相同組換えが発生した細胞では全長 EGFP 遺伝子が再構築され、GFP シグナルを発する。それをフローサイトメトリーにより検出し、遺伝子改変効率を定量した。

最後に、との実験で得られたデータの統合的解析により、AAV ターゲッティングベクター内での各プロモーターの転写活性とそのベクターの遺伝子改変効率との相関性を調べた。

(2) AAV ターゲッティングベクターにおけるプロモータートラップ法の検討

AAV ターゲッティングベクターにおける 2A 配列と IRES のプロモータートラップ機能の比較

2A 配列と IRES のプロモータートラップ機能を比較検討するため、まず、2A 配列ならびに IRES に基づくプロモータートラップ・システムをそれぞれ AAV ベクターに組み込んだ。得られたそれぞれのベクターを用いて(1)で記した *PIGA* 遺伝子ならびに Hyg^R-5' EGFP 融合遺伝子のアッセイ系に対応するターゲットベクターを構築し、細胞に導入した。導入対象には、*PIGA* 遺伝子の系では 5 個のヒト細胞株 (HCT116、DLD-1、AsPC-1、PL5、HuP-T3) を、Hyg^R-5' EGFP 融合遺伝子の系では HCT116 および DLD-1 細胞株を選んだ。遺伝子改変効率は前項と同様にフローサイトメトリーによって計測した。

CRISPR-Cas9 システムを利用した遺伝子ターゲットにおける 2A 配列と IRES のプロモータートラップ機能の比較

ターゲットベクターを CRISPR-Cas9 システムの DNA 修復鋳型に用いる場合、ターゲットベクター内のプロモータートラップ・システムに 2A 配列と IRES のどちらを利用するとより高いプロモータートラップ効果をもたらすかを検討した。まず、プロモータートラップ・システムに 2A 配列と IRES をそれぞれ利用したプラスミド製ターゲットベクターを構築し、CRISPR-Cas9 システムの発現ベクターとともに HCT116 および DLD-1 細胞株に導入した。アッセイ系には *PIGA* 遺伝子の系を使用した。遺伝子改変効率の測定はフローサイトメトリーではなく制限酵素による RFLP 解析によって行った。

4. 研究成果

(1) AAV ターゲッティングベクターに搭載するプロモーターの検討

各プロモーターの転写活性の検討

AAV ベクター導入後 2 日目の解析では、検討した 4 細胞株のすべてにおいて、6 種類のプロモーターのうち CMV プロモーターが最も強い転写活性を示した。AAV ベクター導入後 2~8 週の解析でも、6 種類のプロモーターのうち CMV プロモーターが最も強い転写活性を示したが、MCF-10A 細胞株における CMV プロモーターの長期的転写活性は例外的に低く、CAG、SV40、HSV-TK の各プロモーターと有意差がなかった。MCF-10A 細胞株ではむしろ、ヒト遺伝子である *hACTB* および *hEF1* のプロモーターが強い長期的転写活性を示した。細胞株 HCT116 と DLD-1 における CMV プロモーターの転写活性は、導入後 4~6 週をピークとして減衰する傾向を示した。

3 種類の細胞株 (HCT116、DLD-1、HT-1080) を対象に行った G418 耐性コロニー形成試験では、いずれの細胞株においても、6 種類のプロモーターのうち CMV プロモーターを用いてネオマイシン耐性遺伝子を制御した場合に最も多数のコロニーが形成された。これは、上記の実験 (各プロモーターの下流に EGFP 遺伝子をつなぎ、蛍光強度によってプロモーターの転写活性を定量した実験) のデータと合致する結果と考えられた。

各プロモーターを使用した AAV ターゲッティングベクターの遺伝子改変効率の検討

PIGA 遺伝子と Hyg^R-5' EGFP 遺伝子のどちらを用いたアッセイ系でも、6 種類のプロモーターのうち CMV プロモーターを用いてネオマイシン耐性遺伝子を制御した AAV ターゲッティングベクターが最も低い遺伝子改変効率を示した。この結果は、アッセイに使用したすべての細胞株に共通していた。

以上のとより、最も転写活性の強い CMV プロモーターを使用した場合の遺伝子改変効率が最も低値になるという結果になった。このことから、AAV ターゲッティングベクターには転写活性の強いプロモーターを無条件に採用せず、プロモーターの選択を注意深く行う必要があることが示唆された。当研究グループの知る限り、ターゲットベクター内の薬剤耐性遺伝子を制御するプロモーターの選択が遺伝子改変効率に影響するという知見は本研究によって初めて報告されたものである。

(2) AAV ターゲッティングベクターにおけるプロモータートラップ法の検討

AAV ターゲッティングベクターにおける 2A 配列と IRES のプロモータートラップ機能の比較

プロモータートラップ法は効率よく遺伝子改変を行うための優れた手法であり、一般によく使用される。この手法では、ターゲットベクターはプロモーターを持たず、ゲノムの非遺伝子領域に挿入された時には

ベクター内の薬剤耐性遺伝子が発現せず、相同組換えにより目的の遺伝子座に組み込まれた時には薬剤耐性遺伝子が発現するようにベクター構造上の工夫がなされている。そのため、ターゲティングベクター導入後の薬剤選択により遺伝子改変細胞が濃縮され、高効率な遺伝子改変が実現される。

現在まで、AAV ターゲティングベクターにおけるプロモータートラップ・システムの大半は IRES を用いて構築されてきた。本研究では、2A 配列に基づくプロモータートラップ・システムを構築し、AAV ターゲティングベクターにおける 2A 配列と IRES のもたらすプロモータートラップ機能を比較した。

その結果、採用したいずれのアッセイ系でも、2A 配列によるプロモータートラップ機能が IRES を上回った。2A 配列を搭載した AAV ターゲティングベクターによる遺伝子改変の発生頻度は、IRES を搭載したベクターの 3.4~28 倍に達した。ベクターのゲノムへのランダム挿入と遺伝子改変との発生頻度の割合についても、2A 配列を搭載したベクターの方が遺伝子改変の起きる割合が相対的に高く、IRES を搭載したベクターの約 2~5 倍であった。

当研究グループが知る限り、AAV ターゲティングベクターに 2A 配列に基づくプロモータートラップ法を導入し、遺伝子改変効率を向上させることに成功したのは本研究が初めてである。また、ターゲティングベクターにおける 2A 配列と IRES のプロモータートラップ機能を体系的に比較検討したのも、本研究が初めてと考えられる。本研究の成果を利用して、将来的に AAV ターゲティングベクターによる遺伝子改変がより効率化され、CRISPR-Cas9 などのゲノム編集法を補完する技術として一層進化していくことが期待される。

CRISPR-Cas9 システムを利用した遺伝子ターゲティングにおける 2A 配列と IRES のプロモータートラップ機能の比較

CRISPR-Cas9 システムの DNA 修復鋳型においては、2A 配列は必ずしも IRES を上回るプロモータートラップ機能を示さなかった。すなわち、DNA 修復鋳型のゲノムへのランダム挿入と遺伝子改変との発生頻度の割合は、プロモータートラップに 2A 配列を用いた場合と IRES を用いた場合との間で有意差がなかった。しかし、遺伝子改変の発生頻度自体は 2A 配列をプロモータートラップに使用した場合の方が高値であり、IRES を使用した場合の 4.3~15 倍に達した。

<引用文献>

1) Russell DW and Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet*, 18, 325-330, 1998.

2) Konishi H, Karakas B, Abukhdeir AM,

Lauring J, Gustin JP, Garay JP, Konishi Y, Gallmeier E, Bachman KE, and Park BH. Knock-in of mutant K-ras in nontumorigenic human epithelial cells as a new model for studying K-ras mediated transformation. *Cancer Res*, 67: 8460-8467, 2007.

3) Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, and Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17773-17778, 2011.

4) Barzel A, Paulk NK, Shi Y, Huang Y, Chu K, Zhang F, Valdmanis PN, Spector LP, Porteus MH, Gaensler KM, and Kay MA. Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice. *Nature*, 517: 360-364, 2015.

5) Topaloglu O, Hurley PJ, Yildirim O, Civin CI, and Bunz F. Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines. *Nucleic Acids Res*, 33: e158, 2005.

6) Konishi H, Lauring J, Garay JP, Karakas B, Abukhdeir AM, Gustin JP, Konishi Y, and Park BH. A PCR-based high-throughput screen with multiround sample pooling: application to somatic cell gene targeting. *Nat Protoc*, 2: 2865-2874, 2007.

7) Karnan S, Konishi Y, Ota A, Takahashi M, Dandindorj L, Hosokawa Y, and Konishi H. Simple monitoring of gene targeting efficiency in human somatic cell lines using the PIGA gene. *PLoS One*, 7: e47389, 2012.

8) Konishi Y, Karnan S, Takahashi M, Ota A, Dandindorj L, Hosokawa Y, and Konishi H. A system for the measurement of gene targeting efficiency in human cell lines using an antibiotic resistance-GFP fusion gene. *BioTechniques*, 53: 141-152, 2012.

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)

Karnan S, Ota A, Konishi Y, Wahiduzzaman M, Hosokawa Y, and Konishi H. Improved methods of AAV-mediated gene targeting for human cell lines using ribosome-skipping 2A peptide. *Nucleic Acids Res*, 44: e54, 2016. 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkv1338

Tanaka M, Miura Y, Numanami H, Karnan S, Ota A, Konishi H, Hosokawa Y, and Hanyuda M. Inhibition of NADPH oxidase 4 induces apoptosis in malignant mesothelioma: Role of reactive oxygen species. *Oncol Rep*, 34: 1726-1732, 2015. 査読有
DOI: 10.3892/or.2015.4155

Ono T, Ota A, Ito K, Nakaoka T, Karnan S, Konishi H, Furuhashi A, Hayashi T, Yamada Y, Hosokawa Y, and Kazaoka Y. Plumbagin suppresses tumor cell growth in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Dis*, 21: 501-511, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/odi.12310

Asai A, Karnan S, Ota A, Takahashi M, Damdindorj L, Konishi Y, Hossain E, Konishi H, Nagata A, Yokoo K, and Hosokawa Y. High-resolution 400K oligonucleotide array comparative genomic hybridization analysis of neurofibromatosis type 1-associated cutaneous neurofibromas. *Gene*, 558: 220-226, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.gene.2014

Hossain E, Ota A, Karnan S, Takahashi M, Mannan SB, Konishi H, and Hosokawa Y. Lipopolysaccharide augments the uptake of oxidized LDL by up-regulating lectin-like oxidized LDL receptor-1 in macrophages. *Mol Cell Biochem*, 400: 29-40, 2015. 査読有
DOI: 10.1007/s11010-014-2259-0

Damdindorj L, Karnan S, Ota A, Hossain E, Konishi Y, Hosokawa Y, and Konishi H. A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PLoS ONE*, 9: e106472, 2014. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0106472

Nakaoka T, Ota A, Ono T, Karnan S, Konishi H, Furuhashi A, Ohmura Y, Yamada Y, Hosokawa Y, and Kazaoka Y.

Combined arsenic trioxide-cisplatin treatment enhances apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cell Oncol*, 37: 119-129, 2014. 査読有
DOI: 10.1007/s13402-014-0167-7

Hossain E, Ota A, Karnan S, Damdindorj L, Takahashi M, Konishi Y, Konishi H, and Hosokawa Y. Arsenic augments the uptake of oxidized LDL by upregulating the expression of lectin-like oxidized LDL receptor in mouse aortic endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273: 651-658, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.taap.2013.10.012

Wang GM, Wong HY, Konishi H, Blair BG, Abukhdeir AM, Gustin JP, Rosen DM, Denmeade S, Rasheed Z, Matsui W, Garay JP, Mohseni M, Higgins MJ, Cidado J, Jelovac D, Croessmann S, Cochran R, Karnan S, Konishi Y, Ota A, Hosokawa Y, Argani P, Lauring J, and Park BH. Single copies of mutant KRAS and mutant PIK3CA cooperate in immortalized human epithelial cells to induce tumor formation. *Cancer Res*, 73: 3248-3261, 2013. 査読有
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1578

Hossain E, Ota A, Takahashi M, Karnan S, Damdindorj L, Konishi Y, Konishi H, and Hosokawa Y. Arsenic upregulates the expression of angiotensin II Type I receptor in mouse aortic endothelial cells. *Toxicol Lett*, 220: 70-75, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.04.006

〔学会発表〕(計 13 件)

Sivasundaram Karnan、400K オリゴアレイ CGH を用いた NF1 患者の皮膚神経線維腫の解析、第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸国際展示場（兵庫県・神戸）

太田明伸、口腔がん細胞株に対するプランバギンのプロオキシダント作用とアポトーシス誘導にはミトコンドリア遺伝子発現系が関与する、第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸国際展示場（兵庫県・神戸）

小西裕之、癌原性 KRAS 変異をノックインしたヒト気管支上皮細胞株モデルの樹立と解析、第 74 回日本癌学会学術総

会、2015年10月8日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋）

太田明伸、Delta40p53はHepG2細胞に対して細胞増殖抑制効果を示す、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋）

小西裕之、アデノ随伴ウイルスに基づく遺伝子改変ベクターにおいて薬剤耐性遺伝子の発現を制御するプロモーターと改変効率の関係、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

太田明伸、リポポリサッカライドはErk1/2シグナルを介したLOX-1の発現増加によってマクロファージの酸化LDLの取り込みを増強する、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館（京都府・京都）

太田明伸、プランバギンは口腔扁平上皮癌に対して活性酸素産生を介した細胞増殖抑制効果を示す、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

Sivasundaram Karnan、NF1関連の皮膚神経線維腫における400KオリゴアレイCGH解析、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

小西裕之、ヒト細胞株のゲノム編集によるKRAS-PI3Kシグナル経路の解析、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

太田明伸、三酸化ヒ素（ATO）とシスプラチン（CDDP）は口腔扁平上皮癌細胞株に対して相乗的な細胞障害効果を示す、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

太田明伸、ヒ素は酸化LDL受容体LOX-1の発現を増加させることによりマウス血管内皮細胞の酸化LDL取り込み能を増強する、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）

Sivasundaram Karnan、KRAS変異およびPIK3CA変異のノックインを施したヒト上皮細胞株の生化学的解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

Hossain E、Arsenic trioxide inhibits

interferon-gamma-mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 裕之 (KONISHI HIROYUKI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：20344335

(2) 研究分担者

細川 好孝 (HOSOKAWA YOSHITAKA)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：60229193

(3) 連携研究者 なし