

新しいES細胞分化システムを用いた細胞分化におけるゲノム機能の系統的解析

●山下潤

京都大学再生医科学研究所

<研究の目的と進め方>

我々は、胚性幹(ES)細胞を用いた心血管分化研究を行ってきた。すなわち、ES細胞からFlk1陽性の中胚葉レベルの細胞を分化誘導し、そこから血管を分化誘導する新しい分化誘導系を開発した(Nature, 2000)。また同システムを用いて2次元培養下に心筋細胞を誘導する新しい方法の開発に成功し、新しい心筋前駆細胞の同定にも成功した(FASEB J, 2005)。さらに本研究期間中に心筋ペースメーカー機能の解析(Stem Cells, 2007)及び動脈リンパ管内皮細胞の系統的誘導に成功した(2 x Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)。これらの成果により、広汎な心血管系細胞の分化多様化過程を培養下に再現することが可能な新しい系統的細胞分化発生システムが構築された。さらにES細胞における新しい遺伝子機能解析系も構築した(Biochem Biophys Res Commun, 2006)。現在心血管細胞分化過程における遺伝子プロファイルを作製している。またヒトES細胞の心筋及び血管細胞分化に成功した。本研究は、同ES細胞心血管分化系をモデルとして細胞分化をゲノムレベルで解析し理解することを目的とする。研究期間内においては、1) 心血管分化多様化過程における遺伝子プロファイル作製。2) 分化段階特異的遺伝子の機能解析。3) ヒトES細胞における実験システム構築。4) 恣意的遺伝子操作による細胞形質と遺伝子発現パターン変化の相関解析。5) メチル化DNAの網羅的解析。これら5項目の研究により、ヒトを含めた細胞分化におけるゲノム機能とその意義を包括的に明らかにする。正常発生から何かを壊すことによりその意義を検討する遺伝子改変動物研究に対し、本研究は、細胞そのものを作り出すことによる構造的な(constructive)発生物学である。モデル生物とは異なるモードの新たなゲノム解析のソースを提供し解析できることにより、ゲノム機能の複眼的理解をもたらすことができる。

本研究期間中に、京都大学山中伸弥教授によりマウス及びヒト組織からES細胞様の新しい多能性幹細胞、iPS細胞(人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cells)が樹立された。我々はいち早くiPS細胞の心血管分化研究に取り組み、マウスiPS細胞を用いて、従来のマウスES細胞と同等の系統的血管分化誘導システムを構築し、種々の心血管細胞の誘導に成功した(Circulation, 2008)。マウスES細胞と同様にiPS細胞の血管分化過程における遺伝子プロファイルを作製し、未分化幹細胞から心血管細胞に至る過程をES細胞及びiPS細胞において比較検討する。発現の異なる遺伝子に関して、エピジェネティックな変化など、その原因を検索することを試みる等、iPS細胞の分化とゲノム機能研究の基盤形成を行う。

<研究開始時の研究計画>

我々は従来よりES細胞を用いた心血管分化再生研究を進めてきている。現在では、Flk1陽性前駆細胞から、心血管系細胞の分化・多様化過程を系統的構造的に再現することが可能である。遺伝子発現解析に関しては、種々の分化段階のES細胞由来細胞群を用いて、ES細胞分化過程における遺伝子プロファイル作り

を行っている(チップ: Affymetrix; 解析ソフト: eXintegrator, CDB, 理研及び Genespring, Silicon genetics 社)。同定遺伝子の機能解析に関しては、ES細胞において任意の分化段階においてshRNAを発現し、標的遺伝子の発現を阻害することの出来るES細胞対応のshRNA発現システムを構築している。

- 1) 動脈リンパ管内皮細胞分化システムの構築: 従来の方法によりFlk1陽性細胞から誘導した血管内皮細胞はおもに ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞であることがわかっている。新しく動脈内皮細胞およびリンパ管内皮細胞の分化誘導を試み、動脈リンパ管への血管多様化過程の解析を可能とする。
 - 2) 心血管分化における遺伝子プロファイルの作製: 既に構築した血管分化過程における遺伝子プロファイルに加えて、
 - i) 心筋分化過程における遺伝子発現プロファイル作製
 - ii) 心筋多様化過程における遺伝子発現プロファイル作製
 - iii) 動脈分化における遺伝子発現プロファイル作製心血管分化多様化に関与する候補遺伝子を網羅的に同定する。
 - 3) 同定候補遺伝子からの機能遺伝子の同定
 - i) in situ hybridization による遺伝子発現の検討
 - ii) テトラサイクリン誘導性ショートヘアピンRNA (shRNA)を用いた遺伝子機能阻害実験
 - iii) 誘導性遺伝子発現による候補遺伝子過剰発現実験
 - 4) ヒトES細胞を用いた心血管分化システムの構築: ヒトES細胞の心血管分化系をマウス同様の詳細な解析が可能なモデルへと発展させ、種々の細胞群を用いたDNAチップ解析を行う。
 - 5) 恣意的遺伝子操作による細胞形質と遺伝子発現パターン変化の相関解析: 同定した遺伝子を発現操作しながら分化誘導し、遺伝子プロファイルと細胞形質を相互参照し解析する。種々の遺伝子に関して同様の解析を繰り返し、特定の形質発現に必要な遺伝子群の重要度をスコア化する。
 - 6) iPS細胞を用いた心血管分化再生研究: 1) - 5)の研究をマウス及びヒトiPS細胞にも拡張し新しい心血管分化解析システムを構築する。
- 以上6項目の研究を行い、心血管細胞分化過程におけるゲノム機能の包括的理解を目指す。

<研究期間の成果>

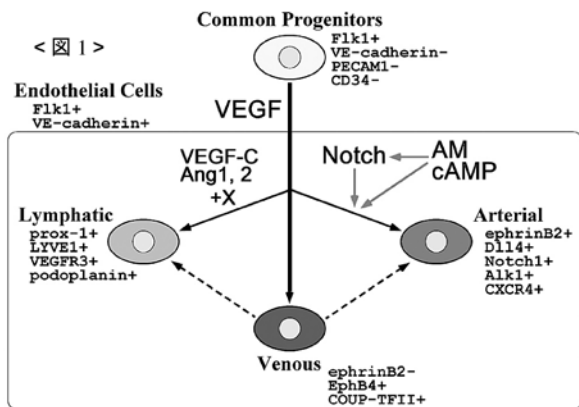
- 1) 動脈内皮細胞の分化誘導と純化: 研究代表者らのES細胞心血管分化系を用いて、動脈内皮細胞を分化誘導し純化することに成功した。すなわち、Flk1陽性細胞をVEGFに加えサイクリックAMPまたはアドレノメデュリン(AM)の共在下に培養すると ephrinB2 陽性の動脈内皮細胞が誘導された。ケモカイン受容体CXCR4が動脈内皮細胞マーカーであることを見出し、CXCR4に対する抗体を用いて誘導した動脈内皮細胞を純化することにも成功した。動脈内皮細胞分化にはNotchシグナルが必須であることに加え、サイクリックAMPが分化途上の内皮細胞においてNotchシグナルを活性化すること、

VEGF, Notch, サイクリック AMP の3者が動脈内皮細胞誘導に独立して必要であること、及びこれら3者によりFlk1陽性前駆細胞から動脈内皮細胞を構成的に誘導できることを示した(Yurugi-Kobayashi, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)。

2) リンパ管内皮細胞の分化誘導と純化: さらにFlk1陽性前駆細胞からのリンパ管内皮細胞分化誘導も試みた。Flk1陽性細胞をマウスストローマ細胞株OP9細胞上で培養するとリンパ管マーカーprox1陽性のリンパ管内皮細胞が誘導された。リンパ管内皮細胞誘導には、VEGF-C及びアンジオポイエチンが必要であること及びOP9由来因子が必要であることを示した。また、抗3型VEGF受容体抗体やLYVE-1抗体を用いてリンパ管内皮細胞を純化することにも成功した(Kono, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)。

これらの成果により、動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれ系統的構成的に分化誘導し、その分化機構を解析することが可能となった(図1: Yamashita, Trends Cardiovasc Med, 2007より改変)。また純化動静脈リンパ管内皮細胞を用いた遺伝子プロファイル作製と動静脈リンパ管分化機構の解析が可能となった。

さらにcAMP経路の下流の探索を行い、Protein kinase A (PKA)がFlk1陽性細胞においてVEGF165の特異的受容体であるFlk1とneuropilin1の発現を上昇させ、Flk1陽性細胞のVEGFに対する感受性を高めることにより内皮細胞分化を促進しているという新しい機構も明らかにした(Yamamizu, Blood, 2009)。

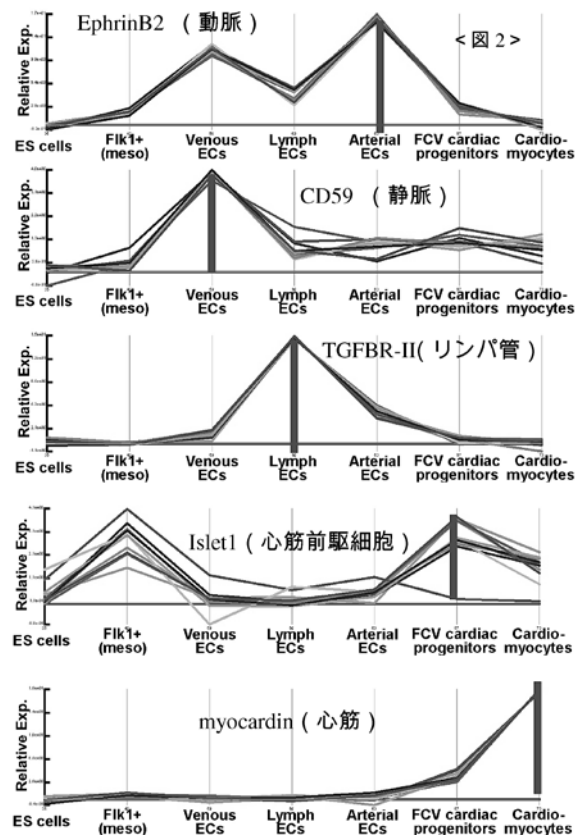


3) 誘導性 shRNA 発現 ES 細胞による遺伝子機能解析系の構築: テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES 細胞を構築し、分化途上の任意の段階において標的遺伝子発現を抑制し、細胞分化を制御できることを示した。すなわち、テトラサイクリン制御配列(tetO)を有する tRNA プロモーターまたは U6 プロモーター下に shRNA を発現するプラスミドを導入した ES 細胞株を作製し、テトラサイクリン投与により shRNA 発現が誘導されるシステムを構築し(tet-ON)、ES 細胞分化途上の任意の段階において遺伝子発現を阻害することを可能にした。同システムを用いて、内皮細胞分化において必須の遺伝子である Flk1 の発現を内皮細胞分化途上において阻害することにより、ES 細胞からの内皮細胞分化がほぼ完全に阻害された。これらの結果により、ES 細胞分化系を用いて、分化における遺伝子機能を分化ステージ特異的に解析することが可能になるとともに、恣意的遺伝子発現制御により細胞分化を制御することが可能になった(Hiraoka-Kanie, Biochem Biophys Res Commun, 2006)。

さらに新たに、shRNA によるノックダウンと cDNA 発現の

両方を独立して行うことが可能な新しいノックダウンレスキューシステムを構築するため、Cre-loxP システムとエストロゲン受容体-Cre 融合タンパクを用いたタモキシフェン誘導性 shRNA 発現系を ES 細胞に導入した新しい遺伝子機能阻害実験系を構築した。ES 細胞分化途上においてタモキシフェン誘導性に中胚葉マーカー Flk1 遺伝子に対する shRNA を発現させることにより、Flk1 陽性中胚葉の誘導を阻害することに成功している。

4) ES 細胞を用いた心血管分化過程遺伝子プロファイルの作製: 上記1) - 3) の成果を加え、未分化 ES 細胞、Flk1+ 中胚葉細胞、動静脈リンパ管血管内皮細胞、心筋前駆細胞(FCV 細胞; Yamashita, FASEB J, 2005)、心筋細胞の各段階の細胞を純化して RNA を抽出し、遺伝子プロファイルを作製した(解析ソフト: eXintegrator, RIKEN)。これにより、心血管系細胞の分化過程における遺伝子発現の変化を細胞系列特異的に解析することが可能となった。図2に、それぞれの細胞特異的遺伝子発現を示した遺伝子の例を示す。



5) ヒト ES 細胞を用いた血管分化誘導システムの構築

ヒト ES 細胞を用いて、マウス ES 細胞と同様の系統的血管細胞分化システムを構築し、ヒト ES 細胞においても血管分化過程の細胞レベルでの解析が可能となった(Sone, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007)。下肢虚血動物モデルへの移植実験においても効果が得られている(Yamahara, PLoS One, 2008)。

6) マウス人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた心血管分化誘導システムの構築

2006年に報告されたマウス iPS 細胞に対して、我々が構築してきたマウス ES 細胞分化システムを導入し、マウス ES 細胞と同様に系統的な心血管分化誘導に成功した(Narazaki, Circulation, 2008)。マウス ES 細胞において誘導された動静脈リンパ管内皮細胞、心筋前駆細胞をはじめ、これまで誘導

可能であった心血管細胞が全て誘導可能となった。同システムを構築することにより、iPS細胞を新たな解析材料とした心血管分化再生に関するゲノム研究への展開を可能にした。

7) ヒト iPS 細胞を用いた心血管分化誘導

2007年に報告されたヒト iPS 細胞を用いた心血管細胞分化実験を開始している。すでに自己拍動する機能的な心筋細胞の誘導に成功している。

8) マウス ES 細胞からの高効率心筋前駆細胞及び心筋細胞分化誘導法の開発

免疫抑制剤サイクロスポリン A (CSA) が強力な心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化誘導効果を有していることを見出した。CSAによりこれら心筋系細胞の誘導効率は約10-20倍増加し、潤沢な心筋前駆細胞の採集が可能となった。新しい心筋前駆細胞治療の可能性を拓いた (Yan, Biochem Biophys Res Commun, 2009)。

<国内外での成果の位置づけ>

- 1) ES細胞からの動脈内皮細胞の分化誘導は世界初の報告である(平成21年12月1日時点でも本報告のみ)。Notchに加えてサイクリック AMP 経路が動脈内皮分化に必要であることも初めて示した。分化過程の内皮細胞において、サイクリック AMP が Notch を活性化することを示したが、サイクリック AMP と Notch 経路の連関も初めて明らかにした。
- 2) ES細胞からのリンパ管内皮細胞誘導は2006年に研究代表者を含め3ヶ所から報告された。研究代表者以外の2つはembryoid body(胚様体)を用いた方法であり、リンパ管内皮分化の分子機構に関する知見に乏しい。研究代表者等はリンパ管内皮誘導因子の存在の可能性を示している。
- 3) 動脈リンパ管の3種類の内皮細胞をすべて分化誘導することに成功しているのは、研究代表者のグループのみである(1)–(3)の業績により、2006年国際血管細胞生物学会招請講演。2008年同学会口頭発表。2007年 Trends Cardiovasc Med 誌 Review (依頼寄稿)。
- 4) PKA が Flk1 陽性血管前駆細胞の VEGF165 に対する感受性を10倍以上上昇させるという研究代表者らの知見は、前駆細胞の感受性を調節することにより細胞分化を制御するメカニズムの存在を明らかにし、血管再生をはじめ種々の再生治療戦略に新たなターゲットをもたらしものである。同業績 (Yamamizu, Blood, 2009) により筆頭著者の山水は、2009年日韓血管生物医学会 YIA (Young Investigators Award) を受賞した。
- 5) 動脈リンパ管と心筋前駆細胞等を含め心血管細胞の分化過程を系統的に再現できるシステムは世界的にも例を見ない。その遺伝子プロファイルの解析は本例以外に報告はない。細胞分化過程を新たな視点で解析しうる先進的実験系が構築されたと考えられる。多数の動脈リンパ管内皮特異的遺伝子群をもとに、血管選択的血管再生や特異的血管リンパ管抑制によるがん治療など新しい臨床応用の可能性が生まれることが期待される。
- 6) ES細胞における誘導性 shRNA 発現システムの報告は2005頃より複数なされている。分化途上の段階で shRNA 発現を誘導し目的細胞の分化を阻害した報告は本報告のみである。
- Cre-loxP システムによる shRNA 発現 ES細胞の報告はすでにあるが、薬剤(タモキシフェン)を用いて分化途上において誘導性に発現させるシステムの報告はない。
- 7) マウス iPS細胞を用いた心血管細胞分化に関しては2008年に研究代表者らを含め3ヶ所から報告されたが、研究代表者

らの業績は (Narazaki, Circulation, 2008)、2008年国際幹細胞学会口頭発表演題への選出や Circulation 誌 2008年掲載全論文中から基礎科学部門第1位の *Best Paper Award* を受賞するなど、世界的に非常に高い評価を受けた。

- 8) CSAによる心筋分化誘導効果は、これまでの単剤による効果としては最大と考えられる。また心筋前駆細胞を特異的に増加させる物質は他に報告がない。潤沢に心筋前駆細胞を準備することを可能にし、新しい心筋分化機構の解析と細胞治療応用の可能性を拓いた。同業績 (Yan, Biochem Biophys Res Commun, 2009) により筆頭著者の Yan は 2008年度日本循環器学会留学生 YIA を受賞した。

このように本研究における種々の成果は国内外において高い評価を受けており、世界的にも先端的である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- 1) 心血管分化における遺伝子プロファイルから同定した候補遺伝子の機能解析: 誘導性 shRNA 発現システムの構築に難渋し、候補遺伝子群の機能解析の開始が遅くなった。通常の細胞株や未分化 ES細胞における shRNA 発現と遺伝子発現抑制は容易であったが、分化途上における遺伝子発現抑制においては、誘導性 shRNA 発現のリークに加え、遺伝子サイレンシングや遺伝子導入効率など分化過程に特異的問題が起こり、サイレンシングを受けにくい株の選定方法や shRNA 遺伝子導入方法等の種々の検討が必要であったため。
- 2) 遺伝子発現抑制-レスキューシステムの構築: 上記1)のシステムをさらに発展させたノックダウン-レスキューシステムを HPRT 遺伝子座への標的 cDNA 導入システムの構築に難渋した。現在、マウス ROSA26 領域に FRT 配列を導入し Fip-in recombinase システムにより、ROSA locus に遺伝子を導入するシステムを構築している。
- 3) 心血管分化機能遺伝子の同定: 上記レスキューシステムの構築が遅れたため、候補遺伝子の機能解析が進まなかった。

<今後の課題、展望>

- 1) iPS細胞に関して心血管分化における遺伝子プロファイルを作製し、マウス ES細胞と比較検討する。現在生殖細胞系コンピテント iPS細胞、肝臓由来 iPS細胞、胃由来 iPS細胞、プラスミドによる iPS細胞など種々の iPS細胞を用いて分化誘導と遺伝子プロファイル作りを進めている。
- 2) 上記ノックダウン-レスキューシステムの構築に基づく分化機能遺伝子の同定: 効率的機能解析による網羅的同定を可能とする(50-100以上の候補遺伝子の解析を目指す)。
- 3) ヒト ES細胞および iPS細胞への実験システムの展開: ヒト心血管細胞分化におけるゲノム機能の解析とその再生医療応用及びゲノム研究の社会還元を目指す。

<研究期間の全成果公表リスト>

- 1) 論文/プロシーディング(査読付き)
 1. 0912021012 Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK*. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. **Blood**, 114:3707-3716 (2009)
 2. 0912021017 Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK*. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem

- cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 115-120 (2009)
3. 0901132005 Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK*. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 118: 498-506 (2008)
 4. 0901132011 Nakao Y*, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, Yamashita JK*. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 18: 2982-2984 (2008)
 5. 0901132016 Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Nakao K. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cell-derived endothelial and mural cells. *PLoS One*, 3: e1666 (2008)
 6. 0801251841 Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor [beta]. *J Appl Physiol*, 104: 766-772 (2008)
 7. 0801251837 Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Yamashita JK*. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells*, 25: 2712-2719 (2007)
 8. 0801251827 Sone M, Itoh h, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa SI, Nakao K. A pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 2127-2134 (2007)
 9. 0708071609 Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. *Trends Cardiovasc Med*, 17: 59-63, 2007.
 10. 0702141124 Hiraoka-Kanie M, Miyagishi M, Yamashita JK. Differentiation stage-specific analysis of gene function with inducible short hair-pin RNA in differentiating embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 351: 669-674 (2006)
 11. 0912020957 Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 1977-1984 (2006)
 12. 0912021003 Kono T, Kubo H, Shimazu C, Ueda Y, Takahashi M, Yanagi K, Fujita N, Tsuruo T, Wada H, Yamashita JK. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 2070-2076 (2006)
 13. 0912021007 Nakao Y, Yoshida S, Matsunaga S, Shindoh N, Terada Y, Nagai K, Yamashita JK, Ganesan A, Soest van RW, Fusetani N. Azumamides A-E: Histone Deacetylase Inhibitory Cyclic Tetrapeptides from the Marine Sponge *Mycale izuensis*. *Angew Chem Int Ed*, 45: 7553-7557 (2006)
- 2) 学会発表
1. Yamashita JK. Vascular cell differentiation and diversification from ES and iPS cells. The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, Aug 20-21, 2009. Seoul, Korea.
 2. Narazaki G, Yamashita JK. iPS cell differentiation system for cardiovascular cells. FASEB Summer Research Conferences "Smooth muscle", Aug 2, 2009. Lucca, Italy
 3. Yamashita JK. Cardiovascular cell differentiation from ES and iPS cells. EMBO Workshop "Lymphatic and Blood Vasculature: From models to human diseases", Jun 4-5, 2009. Helsinki, Finland
 4. Yamashita JK. Research for cardiovascular development and regeneration with ES and iPS cells. Chemical EPIgenomics Symposium - The fusion of epigenetics, stem cell biology and chemical biology -, Mar 12, 2009, Singapore
 5. Yamashita JK. Molecular mechanisms of arterial-venous specification. 第16回日本血管生物医学会・日韓合同血管生物シンポジウム (invited). 2008. 12. 3-5. 金沢
 6. Yamashita JK. Cellular and molecular mechanisms for diversification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells. THE U.S.-JAPAN COOPERATIVE CANCER RESEARCH PROGRAM WORKSHOP (invited), 2008. 3. 19. Kyoto
 7. 山下 潤. ES細胞を用いた新しい構成的アプローチによる血管分化多様化機構の解析と再構成. 第30回日本分子生物学会ワークショップ「血管リンパ管研究の新展開」(オーガナイザー) 2007.12.14. 横浜
 8. Yamashita JK. Prospective identification of cardiac progenitors. 4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences -Cardiovascular Repair and Regeneration. (Invited) 2007.7.30. Keystone, USA
 9. Yurugi-Kobayashi T, Schroeder T, Nagasawa T, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells. 第4回日韓血管生物学シンポジウム (招請講演). 2006.12.13. 東京
 10. Yamashita JK. Differentiation of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells from vascular progenitors. XIVth International Vascular Biology Meeting (Invited) 2006.6.8. Noordwijkerhout, Netherlands.
 11. Yamashita JK. Mechanisms of vascular diversification: An approach from constructive developmental biology using ES cells. 第39回日本発生生物学会ワークショップ"Frontiers in Vascular and Lymphatic Development." (organizer) 2006.5.31. 広島
- (研究室ホームページ)
URL: <http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es02/main-j.htm>