

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03552

研究課題名(和文) ゲノム編集ツールを含有する超音波応答性ナノバブルの開発と疾患治療システムの構築

研究課題名(英文) Development of ultrasound-responsive nanobubbles containing genome editing tools and establishment of disease treatment system

研究代表者

根岸 洋一 (Negishi, Yoichi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50286978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)疾患の治療においては、永久的な遺伝子編集を可能にするゲノム編集システムの筋組織への導入方法が重要と考えられている。本研究では、超音波応答性ナノバブルによるDMDモデルマウス骨格筋組織へのCRISPR-Cas9システムの送達・導入に成功した。実際にCRISPR-Cas9システムを発現プラスミドとしてのみならず、RNA(Cas9mRNA/sgRNA)の状態を導入した場合においても、欠損ジストロフィンタンパク質の発現回復を認めた。よって本ナノバブルによる送達・導入システムは、ゲノム編集を利用したDMD遺伝子治療における有用な一手段となると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DMDモデルマウスを利用した治療研究において、超音波応答性ナノバブルにより、CRISPR/Cas9システムを細胞内送達させ、実際に機能発現した結果は、他の遺伝性疾患治療にも適用可能と考えられる。mRNA送達にも有用性を発揮できることから、がん治療や再生医療分野における新たな治療システム開発に繋がる可能性がある。本研究成果は、さらに標的リガンドを修飾したナノバブルを用いることで、疾患部位の診断と治療の一体化システム(セラノスティクス)の構築に繋がることから、学術的及び社会的にも大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) disease, methods of introducing genome-editing systems into muscle tissue that enable permanent gene editing are considered to be important. In this study, we successfully delivered and introduced the CRISPR-Cas9 system into the skeletal muscle tissue of a DMD model mouse using ultrasound-responsive nanobubbles. In fact, the CRISPR-Cas9 system restored the expression of the defective dystrophin protein not only as an expression plasmid vector but also when introduced as RNA molecules (Cas9mRNA/sgRNA). Therefore, this delivery system using nanobubble is expected to be a useful tool in DMD gene therapy based on genome editing.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ナノバブル 超音波 ドラッグデリバリーシステム ゲノム編集 筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋繊維の変性・壊死を主病変とする遺伝性疾患である。ジストロフィン遺伝子上の変異により、ジストロフィンタンパク質が産生されなくなることで発症する。DMD の治療法の一つとして、半永久的な遺伝子修復を可能とするゲノム編集技術が注目されている。ゲノム編集システム (CRISPR-Cas9 システムなど) とは、DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる新しい遺伝子改変技術のことであることから、難病の根治的治療を可能とする技術として期待されている。その治療の成功には、CRISPR-Cas9 システム (人工ヌクレアーゼ: Cas9 やそれを標的遺伝子へとガイドする RNA: sgRNA) を組織内へと効率的に送達導入する手法が鍵となる。しかしながら、安全性の観点からウイルスベクターを用いずに、*in vivo* でのゲノム編集ツールを疾患組織へと効率的に送達導入させるには、血管内投与後、筋組織に豊富に存在する毛細血管壁を突破させ、筋繊維への送達導入を可能とする実用的デリバリーシステムの開発が望まれる。

これまでに申請者は、血中滞留性に優れたポリエチレングリコール修飾リポソーム (PEG-リポソーム) に目し、超音波造影ガス (C3F8) を内包した微小気泡 (ナノバブル) - バブルリポソームを開発し、薬物・遺伝子導入ツールとして、また、超音波造影剤としても機能することを報告してきた。実際に DMD モデルマウス筋組織へのアンチセンス核酸導入において、ナノバブルと治療用超音波照射を併用することで、導入効率を促進して治療効率を改善できることも明らかとした。以上の背景を踏まえ、ナノバブルと治療用超音波照射の併用が DMD 筋組織へのゲノム編集ツール送達法においても有力な手段となると期待した。即ち、ナノバブルにより、DMD 治療に特化したゲノム編集ツールを豊富な毛細血管で支配されている筋組織へと送達させることで、持続性の高い DMD 遺伝子治療が可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、微小気泡 (ナノバブル) の一つとして開発してきた超音波診断造影と薬物・遺伝子導入を可能とする超音波応答性ナノバブルに、DMD 治療用ゲノム編集ツール (Cas9/sgRNA) を融合することで骨格筋の機能改善のみならず、DMD の骨格筋や心筋の変性壊死を阻止できる非侵襲的な *in vivo* ゲノム編集ツールのデリバリーシステムを構築し、根治的な疾患治療システムの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 超音波応答性ナノバブルの作製

基本脂質として、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG)、1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、DSPE-PEG2000 を用いた。これらを逆相蒸発法 (REV 法) にてリポソームを調製した。粒子径を約 140 nm サイズに調製した。これを密閉ガラスバイアルに注入した後に、超音波造影ガス (パーフルオロプロパンガス: C3F8) を充填した。これを、超音波洗浄機を用いて超音波処理し、超音波応答性ナノバブルを作製した。核酸類のナノバブルの搭載には、DPPG を基本脂質としたナノバブルにカチオン性高分子ポリマーを添加して調製した。粒子径の測定は、Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd) を使用した。

(2) ゲノム編集用ツール

Cas9 遺伝子と guide RNA (DMD モデルマウスのジストロフィン遺伝子変異エクソン近傍 PAM 配列を認識) をコードした発現プラスミド DNA (All-in-one CRISPR/Cas9 plasmid DNA) を調製して用いた。また、Cas9 mRNA を TriLink BioTechnologies より購入し、Small guide RNA (sgRNA) は、受託合成 (IDT Inc.) したものをを用いた。

(3) 超音波応答性ナノバブルへの RNA 搭載

カチオン性高分子ポリマーを表面コートしたナノバブルに Cy3 ラベル化 mRNA を添加し、RNA の搭載量をフローサイトメトリー (FACS) にて測定し、ナノバブルの RNA 搭載能を評価した。FACS の結果を踏まえ、さらに Luciferase mRNA あるいは Cas9 mRNA/sgRNA をカチオン性高分子ポリマーコートしたナノバブルへと静電的相互作用にて搭載した。

(4) 骨格筋への CRISPR/Cas9 システム導入

5-6 週齢の *mdx* マウスの前脛骨筋に CRISPR/Cas9 プラスミド DNA とナノバブルを局所投与し、直ちに、前脛骨筋に対して超音波照射 (1MHz、2w、50%duty) した。超音波照射装置は SONITRON 2000 (NEPA GENE, CO, LTD) を用いた。同様な手法でレポーター遺伝子 (Luciferase または GFP) をコードした mRNA (TriLink BioTechnologies より購入) あるいは RNA の状態で CRISPR/Cas9 システムの導入を実施した。CRISPR/Cas9 システムの効果については、導入 14 日目の導入筋組織を回収し、凍結切片を作成した。得られた組織切片を抗ジストロフィン抗体 (NCL-DYS2) と反応さ

せた。洗浄後、二次抗体 Alexa Fluor 546 あるいは Alexa Fluor 488 で反応させた。洗浄後、VECTASHIELD Hard・Set Mounting Medium with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZX700) にて観察した。

(5) レポーター遺伝子の導入

5-6 週齢の ICR マウスの前脛骨筋にレポーター遺伝子 (Luciferase または GFP) をコードした mRNA をナノバブルとともに局所投与した。その後、IVIS LuminaIII を用いた *in vivo* ルシフェラーゼイメージングにて経時的 (3-21 日目まで) な発現パターンを解析した。また、GFP mRNA 導入後においては、導入後 5 日目で筋組織を回収し、凍結切片を作成後に蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZX700) にて導入エリアを観察した。

(6) ゲノム編集の確認

ゲノム編集用プラスミドあるいは Cas9mRNA/sgRNA 導入 2 週間後の mdx マウスより導入組織 (脛骨筋) を回収し、凍結組織からクリオスタットを用いて調製した切片より QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) にて抽出した。ゲノム DNA を Template として増幅させた DNA を用いて、Cel-I アッセイキット (IDT Inc.) による切断フラグメントの検出を行い、ゲノム編集の有無 (Exon23 の除去) をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

(7) ナノバブルによるナノ粒子移行性増強効果の検証

蛍光標識 (DiR, 住商ファーマ) したナノ粒子 (DPPC : DSPE-PEG2000 = 94 : 6 (mol ratio)) をマイクロ流体デバイス (NanoAssemblr) にて調製し、これをナノバブルとともに mdx マウスに経静脈的に投与し、超音波照射 (1MHz, 2w, 50%duty) した。その後、ナノ粒子の血管漏出性を光音響イメージング装置 (AcousticX, CYBERDYNE Inc.) にて解析した。さらに照射部位の筋組織を回収し、凍結切片を作成後に蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZX700) にて組織内分布エリアを観察した。

4. 研究成果

(1) ナノバブルによるゲノム編集用プラスミド DNA デリバリーと治療効果の検証

ゲノム編集技術は今まで明確な治療法が確立されていない様々な遺伝性疾患において有用な治療法になり得ると期待され、DMD 治療でも半永久的なジストロフィンタンパク質の産生が可能になると期待されている。さらにこれまでに超音波造影ガスを封入したナノバブルと超音波照射を併用することで遺伝子や核酸の導入効率が向上することを報告してきた。そこで、DMD モデルマウス (mdx) の下肢部筋肉へのゲノム編集用遺伝子デリバリーを試み、ナノバブルと超音波照射を併用することで、ゲノム編集遺伝子の導入効率が向上するのかが検討を行った。

Cas9 ヌクレアーゼタンパク質と sgRNA (DMD モデルマウスのジストロフィン遺伝子変異エクソン近傍 PAM 配列を認識) をコードした 3 種類のゲノム編集用 All-in-one CRISPR/Cas9 プラスミド DNA の中から、最も優れたゲノム編集効率を持つプラスミド DNA を選別するため、それぞれナノバブルとともにプラスミド DNA を mdx 脛骨筋へと超音波照射による導入を行い、2 週間後におけるジストロフィンタンパク質の発現を免疫染色法により比較検討した。その結果、変異エクソンを有する Exon23 を除去するプラスミド DNA において最も多くのジストロフィンタンパク質の発現回復が認められた (図 1)。以上より、本法は、ゲノム編集遺伝子治療に有用な一手段となりうるものと期待される。

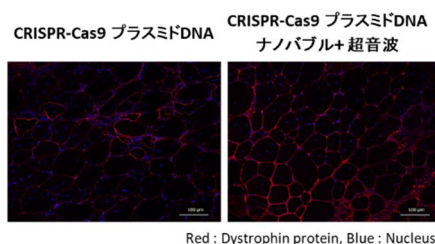


図 1 ナノバブルによる CRISPR/Cas9 プラスミド DNA デリバリー導入筋組織におけるジストロフィンタンパク質を免疫染色法により検出

(2) ナノバブルによる Cas9mRNA/guideRNA デリバリーと治療効果の検証

これまでにナノバブルと超音波照射の併用法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) の mdx 筋組織への導入においてエクソスキッピング誘導に伴う治療効果を発揮できることを報告している。CRISPR/Cas9 システムの場合、Cas9 ヌクレアーゼを mRNA の形態で導入すれば、転写を必要とせずに、容易に細胞質で直接翻訳され、sgRNA と RNP を形成し、これが核に局在することでゲノム編集が可能となる。そこで本研究ではナノバブルと超音波照射併用による RNA デリバリーの可能性を評価するとともに、RNA の状態で CRISPR/Cas9 システムの導入を試み、その治療効果を評価した。

はじめにレポーター遺伝子 (Luciferase または GFP) をコードした mRNA をナノバブルとともに正常マウス (ICR) 脛骨筋へ投与し、直後に超音波照射した。IVIS を用いた *in vivo* ルシフェラーゼイメージングにて発現パターンを解析したところ、mRNA 単独投与と群と比較して、ナノバブルと超音波照射の併用群において比較的早期でかつ高い発現誘導が認められた (図 2A)。また、GFPmRNA の導入後の筋組織内における発現領域を蛍光顕微鏡にて観察したところ、同様にナノバブルと超音波照射の併用群における発現領域の拡大が認められた (図 2B)。これらの結果から、ナノバブルと超音波照射の併用により、筋細胞内への RNA デリバリーが可能となることが明ら

かとなった。この結果をもとに、同様に CRISPR/Cas9 システムへの適用を試みた。Cas9 mRNA と guide RNA (*mdx* マウスのジストロフィン遺伝子変異エクソン近傍 PAM 配列を認識) にナノバブルを混合し、これを筋組織へと局所投与し、直ちに超音波照射を行った。その結果、ジストロフィン陽性の筋線維数が著しく増加することが示される一方で、非照射群においては、ジストロフィンの発現回復をほとんど認めなかった (図 2C)。これらの結果は、通常、裸の RNA を組織に投与した場合、速やかに RNase により分解されることが想定されるが、ナノバブル崩壊に伴うキャピテーション誘導により、瞬時に細胞質内に RNA 産物が導入されたことで、それら CRISPR/Cas9 システムの機能発現につながったのではないかと推察している。今後は実際にジストロフィンタンパク質の発現が持続的であるか、ゲノムレベルでの編集効率の定量的評価等を詳細に検証していく必要があると考えている。

以上より、ナノバブルと超音波照射の併用システムにより、CRISPR/Cas9 システムを RNA の状態で細胞内送達させ、機能発現させることが可能となることを明らかとした。本法は、他の再生医療に繋がるような mRNA デリバリーシステムにも応用可能となるものと期待される。

(3) RNA 搭載ナノバブルの作製と Cas9mRNA/guideRNA デリバリーと治療効果の検証

mdx マウスにおけるジストロフィン遺伝子変異をゲノム編集させる Cas9 mRNA/sgRNA と、ナノバブルによる *mdx* 筋組織への超音波併用導入の効率化を図るために、全身投与を可能とする RNA 搭載型ナノバブルの調製を試みた。RNA 分子の搭載を容易にするためにカチオン性ポリマーを表面コートした超音波応答性ナノバブルを調製した。はじめに RNA の搭載効率を確認するために蛍光ラベル化 RNA をカチオン性ポリマーコートナノバブルへと添加し、RNA の搭載効率を Flow cytometry によって確認したところ、容量依存的なナノバブルへの RNA 搭載が可能であることが示された。同条件で Cas9 mRNA/sgRNA 搭載ナノバブルを調製し、これを静脈内投与したのちに直ちに体外からの超音波照射 (1MHz、2w、50%duty) を行い、搭載 Cas9 mRNA/sgRNA の筋組織への送達導入を試みた。投与 2 週間後の筋組織を回収し、組織切片を作製したのちにジストロフィンタンパク質の発現回復を抗ジストロフィン抗体を用いた免疫染色法により解析した。結果として、十分な発現を認めることができなかった。発現回復が十分確認できなかった理由として、超音波照射後の搭載 Cas9 mRNA/sgRNA が十分に放出されなかった可能性があると考えられた。しかしながら、ナノバブルへの RNA の搭載が可能となったことから、今後、超音波照射条件などを調整することで全身投与可能なゲノム編集用 RNA のデリバリーシステムが構築につなげていく予定である。

(4) ナノバブルによる脂質ナノ粒子デリバリーと組織内分布

ナノバブルと核酸・遺伝子内封可能な脂質ナノ粒子を静脈内投与後に経皮的に体外からの超音波照射を行うことで、照射部位筋組織における脂質ナノ粒子移行性が増強できることが考えられる。そこで DiR 標識脂質ナノ粒子とナノバブルを *mdx* マウスに経静脈内投与し、直ちに体外からの超音波照射 (1MHz、2w、50%duty) を行った。その後の照射部位における脂質ナノ粒子の血管漏出性を超音響イメージング装置にて評価した。さらに照射部位筋組織を回収し、切片作製後に蛍光顕微鏡にて評価した。その結果、血管外筋組織への脂質ナノ粒子の高い集積性が認められ、ナノバブルと超音波照射の併用により、治療用核酸・遺伝子内封可能な脂質ナノ粒子の筋組織移行性が亢進することが示された (図 3A,B)。以上の結果より、ナノバブルと超音波照射の併用システムは、治療用核酸・遺伝子内封ナノ粒子や様々なナノメディシンの血管外組織移行性を向上させる手法として有用性を発揮

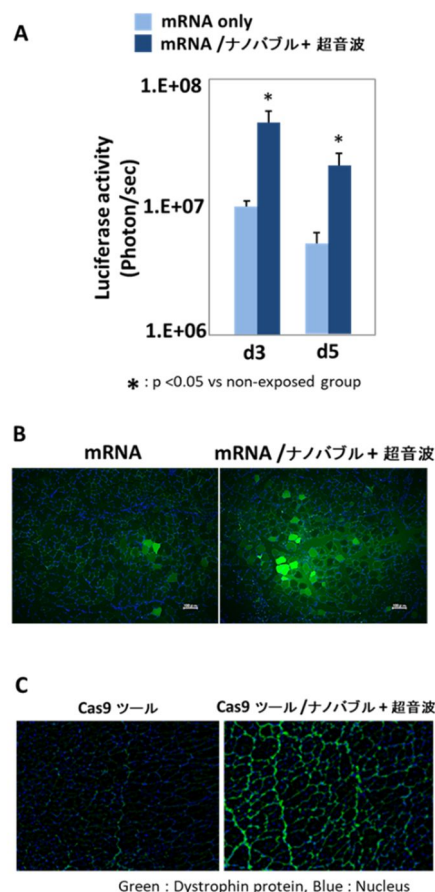


図2 ナノバブルによる RNA デリバリー
A ルシフェラーゼ mRNA 導入後の発現 (IVIS)
B GFP mRNA 導入後の筋組織における発現分布
C Cas9 ツール導入後のジストロフィンタンパク質を検出

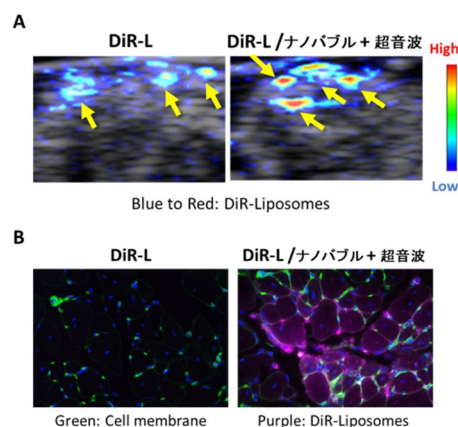


図3 ナノバブルによる脂質ナノ粒子デリバリー
A 超音響イメージング装置による筋組織における DiR リポソームの血管外漏出
B DiR リポソームの筋組織における集積性

できるものと考えられる。

以上の本研究成果から、超音波応答性ナノバブルと超音波照射の併用法により、ゲノム編集ツールとしての CRISPR/Cas9 システムをコードした発現プラスミド DNA あるいは Cas9 mRNA/sgRNA の状態で、送達導入することが可能であり、それが *mdx* マウスにおける欠損ジストロフィンタンパク質の発現回復につながることを明らかにした。本研究遂行で得られた基盤技術は、ゲノム編集ツールのみならず、様々な疾病治療や再生医療に有用な機能的 RNA を選択的に送達するデリバリーシステムの開発や脂質ナノ粒子を含むナノメディスンの送達効率を向上させるためにも有益な情報提供となるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 根岸洋一、佐久間哲史、山本 卓、高橋葉子	4. 巻 3
2. 論文標題 超音波応答性ナノバブルを用いた核酸・遺伝子デリバリーシステムとゲノム編集への応用の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoko Endo-Takahashi, Yoichi Negishi	4. 巻 12
2. 論文標題 Microbubbles and Nanobubbles with Ultrasound for Systemic Gene Delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12100964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Y. Negishi
2. 発表標題 Nucleic acid and gene delivery system by combination of nanobubbles and ultrasound
3. 学会等名 American Society of Gene & Cell Therapy 22nd Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Nirasawa, Y. Mitsuhashi, Y. Endo-Takahashi, N. Hamano, T. Sakuma, R. Suzuki, K. Maruyama, T. Yamamoto, Y. Negishi
2. 発表標題 RNA delivery system using ultrasound-responsive nanobubbles for Duchenne muscular dystrophy
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Nirasawa, Y. Endo-Takahashi, Y. Mitsuhashi, N. Hamano, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Negishi
2. 発表標題 RNA delivery system to muscle tissue by ultrasound-responsive nanobubbles
3. 学会等名 19th Symposium for Gene・Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三橋佑介、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、根岸洋一
2. 発表標題 ナノバブルと超音波併用による筋組織へのmRNA導入法の検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸洋一、高橋葉子、三橋佑介、葦沢 慧、鈴木 亮、丸山一雄
2. 発表標題 超音波応答性ナノバブルによる筋組織へのRNAデリバリー
3. 学会等名 日本DDS学会第35年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸洋一
2. 発表標題 筋疾患治療に向けた核酸・遺伝子デリバリーシステムの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会DDS部会主催合同サテライトシンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸洋一、葦沢 慧、三橋佑介、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄
2. 発表標題 ナノバブルと超音波併用による骨格筋へのmRNAデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葦沢 慧、三橋佑介、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、根岸洋一
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患治療を指向した超音波応答性ナノバブルによるゲノム編集ツールデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第19回夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葦沢 慧、三橋佑介、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、根岸洋一
2. 発表標題 超音波応答性ナノバブルによる筋ジストロフィー疾患モデルへのゲノム編集用RNA送達システムの開発
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 第4回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会セミナー
2. 発表標題 超音波応答性ナノバブルによる筋ジストロフィー疾患モデルへのゲノム編集ツールデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 葦沢 慧、三橋佑介、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、根岸洋一
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸洋一
2. 発表標題 超音波ナノテクノロジーを駆使した次世代ドラッグデリバリーシステムの開発と疾患治療への応用
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸洋一
2. 発表標題 ナノバブルでバリアを超えられるか？・筋疾患へのアプローチ
3. 学会等名 第18回日本超音波治療研究会（JSTU2019）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葦沢 慧、三橋佑介、高橋葉子、鈴木亮、丸山一雄、佐久間哲史、山本 卓、根岸洋一
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患治療を指向した超音波応答性ナノバブルによるゲノム編集用RNAデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 根岸洋一、葦沢 慧、佐久間哲史、山本卓、高橋葉子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 最新のゲノム編集技術と用途展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉川 大和 (Kikkawa Yamato) (20274227)	東京薬科大学・薬学部・准教授 (32659)	
研究分担者	丸山 一雄 (Maruyama Kazuo) (30130040)	帝京大学・薬学部・特任教授 (32643)	
研究分担者	高橋 葉子 (遠藤葉子) (Takahashi Yoko) (30453806)	東京薬科大学・薬学部・助教 (32659)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	道鎮 えりか (Douchin Erika)		
研究協力者	葺沢 慧 (Nirasawa Kei)		
研究協力者	佐々木 愛理 (Sasaki Eri)		
研究協力者	三橋 佑介 (Mitsuhashi Yusuke)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	濱野 展人 (Hamano Nobuhito) (80708397)	東京薬科大学・薬学部・助教 (32659)	
連携研究者	山本 卓 (Yamamoto Takashi) (90244102)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授 (15401)	
連携研究者	佐久間 哲史 (Sakuma Tetsushi) (90711143)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関