

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2013

課題番号：22650119

研究課題名（和文）ペプチド修飾リポソームと超音波技術との融合による骨髄幹細胞への遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Gene transfer system into mesenchymal stem cell by peptide-modified liposomes and ultrasound technology

研究代表者

根岸 洋一（NEGISHI YOICHI）

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50286978

研究成果の概要（和文）：

骨髄幹細胞（MSC）への効率的な遺伝子導入を果たすためには、MSCへの遺伝子取り込みの増大だけでなく、導入遺伝子の細胞内制御も重要であると考えられる。そこで、核移行シグナルペプチド（NLS）を用いて遺伝子を内封した AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを作製した。シンデカンを介した細胞内取り込みのみならず、バブルリポソームと超音波照射を併用することで、遺伝子導入効率が増強可能となることを明らかとした。本研究において開発された AG73 修飾 PEG-NLS リポソームは、AG73 ペプチドによる細胞への親和性の増大と NLS による導入遺伝子の核への移行を制御できるという点で MSC を用いた *ex vivo* 遺伝子細胞療法を行うための有用なツールとして期待された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, to enhance transfection efficiency by promoting the escape of the liposomes from the endosome to the cytosol and the nuclear localization of plasmid DNA, nuclear localization signals (NLS) peptides were used for condensing plasmid DNA encoding luciferase (pCMV-Luc) and embedding it into AG73-PEG liposomes. As a result, AG73-PEG liposomes showed selective gene delivery to cells via syndecan-2. Efficient gene transfection was observed. The efficacy was further enhanced in the combination of Bubble liposomes and US exposure. Thus, the combination of AG73-PEG liposomes with NLS peptides and BLs and US may be useful method to achieve selective and efficient gene delivery. This method may be also expected to a gene transfection system to mesenchymal stem cell in application of *ex vivo* non-viral gene therapy

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800000	0	800000
2011 年度	1000000	300000	1300000
2012 年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総計	2800000	540000	3140000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：ペプチド修飾リポソーム，超音波照射，遺伝子細胞療法

1. 研究開始当初の背景

現在、血管再生分野において、骨髄由来の血管内皮細胞になる幹細胞を用いた細胞療

法の臨床試験が開始されている一方で、十分な血管再生が期待できる細胞の確保が容易でないことが指摘されている。近年、治療効

果を増強するために骨髄由来細胞に血管新生遺伝子をウイルスベクター法により、高効率に導入し、それを生体内投与する遺伝子細胞療法の研究が進められている。しかし、その導入法の安全性が危惧されている。申請者は、これまでに新規な超音波造影ガス封入リポソーム（バブルリポソーム）の開発を行い、このバブルリポソームが新規の遺伝子導入ツールとなることを報告している (R. Suzuki et al, *J. Control Release*, 117, 130, 2007, Y. Negishi et al, *J. Control Release*, 132, 124, 2008). これは、バブルリポソームに1~2 MHz の治療用超音波を照射すると、キャビテーション誘導（バブルの崩壊）に伴うマイクロジェット流が、細胞膜に一過性の小孔を開け、共存する遺伝子を細胞内に導入するという安全性の高い導入法である。その安全性を鑑み、本法による骨髄幹細胞 (MSC) への遺伝子導入を試みたが、導入される細胞のバラツキが大きいため、疾患治療を目的とした遺伝子細胞療法への適用が難しいと思われた。最近、申請者らは、遺伝子封入ペプチド修飾リポソームを細胞内へとエンドサイトーシスによって取り込ませた後に上述の超音波技術を利用すると、遺伝子導入レベルが、効率よく上昇することを見出している (Y. Negishi et al, *Mol Pharm.*, 7, 217, 2010). そのような背景から、上述した両者の研究基盤を融合させることで、*ex vivo* での超音波技術を利用した MSC の高効率遺伝子導入システムの開発、さらには血管再生療法に向けた遺伝子細胞療法への展開が可能となるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、MSC への遺伝子導入を可能とするリポソームを作製し、それを利用した効率的遺伝子導入法を確立する。レポーター遺伝子、さらには血管新生再生を可能とする血管新生遺伝子をエンドサイトーシスを介して、細胞内へと導入し、これまでに開発してきた超音波造影ガス封入リポソーム（バブルリポソーム）と超音波エネルギーを融合した新規な高効率遺伝子導入システムを開発する。さらには、虚血モデルマウスを用いた遺伝子細胞療法への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) MSC における受容体発現解析

ラミニン由来ペプチド AG73 のレセプターとして考えられているシンデカン2が、MSC に発現しているかを確認するために抗シンデカン2抗体を用いて、フローサイトメトリ

ー (FACS) により解析した。MSC の調製に関しては、マウス大腿骨より採取し、10% FCS を含有した MSC 専用培地である MF-medium 中で、5% CO₂ 存在下、37° C にて培養し、Sub-confluence に達した細胞を 0.25% EDTA-Trypsin 処理によりディッシュから剥離し、懸濁後、実験に使用した。

(2) 遺伝子内封ペプチド修飾リポソームの調製

DOPG, DOPE, distearoylphosphatidyl ethanolamine-PEG₂₀₀₀-OME (DSPE-PEG₂₀₀₀-OME; 日本油脂), または distearoylphosphatidyl ethanolamine-PEG₂₀₀₀-maleimide (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal) 溶液を、脂質組成が DOPG : DOPE : DSPE-PEG₂₀₀₀ = 2 : 9 : 0.55 となるように、lipid film を調製した。調製した総脂質量 137.5 nmol の lipid film に 250 μL の pDNA/poly-*l*-lysine complex (DPC) を加え、vortex にて lipid film を懸濁した。これをバス型ソニケーターを用い超音波処理してリポソームを微粒子化した。リポソームとペプチドの反応部位であるマレイミド基と相互作用する Cys-AG73 ペプチドを混合し、室温でインキュベートした。さらに、透析用セルロースチューブを用いて透析バッファー (10 mM HEPES buffer; pH 7.4) で未反応の Cys-AG73 ペプチドを除去し AG73 修飾 PEG リポソームを得た。内封遺伝子複合体に関しては、HEPES buffer (10 mM; pH 7.4) に 0.1 mg/mL の濃度で溶解した 125 μL の poly-*l*-lysine (PLL) と、等量の pDNA (0.1 mg/mL) を混合し vortex することで静電的に相互作用させ pDNA/poly-*l*-lysine complex (DPC) とした。

(3) リポソームの粒子サイズ、ζ 電位の評価

調製した DPC とリポソームは適量の HEPES buffer (10 mM; pH 7.4) を用いて希釈し、NICOMP380 ZLS (Particle Sizing Systems) を用いて粒子サイズ、ζ 電位を測定した。

(4) AG73 修飾 PEG リポソームによる遺伝子導入

調製した MSC を 5×10⁴ cells/well となるように 48 well culture plate に播種後、1日間培養し、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現する pDNA (pcDNA3-Luc) を封入した AG73 修飾 PEG リポソーム (pDNA; 3 μg/mL) を加え、37° C, 4時間培養した。その後、10% FCS 含有 DMEM を加えた。

(5) st-AG73 修飾リポソームの調製

調製した総脂質量137.5 nmolのlipid filmに250 μ LのDPCを加え、10分間室温で静置し、vortexしてlipid filmを懸濁した。これをバス型ソニケーターを用い5分間超音波処理してリポソームを微粒子化した。リポソームに総脂質量の1 mol%分のst-AG73ペプチドを混合し、30分間室温でインキュベートし、st-AG73修飾リポソームを得た。調製したリポソームは適量のHEPES buffer (10 mM; pH 7.4)を用いて希釈し、NICOMP380 ZLS (Particle Sizing Systems)を用いて粒子サイズ、 ζ 電位を測定した。

(6) Cys-AG73 修飾 PEG リポソームによる遺伝子導入

調製したMSCを 5×10^4 cells/wellとなるように48 well culture plate (IWAKI)に播種後、1日間培養し、無血清培地で2回洗浄した後、FCSを含有しないDMEMに交換し、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現するpDNA (pcDNA3-Luc)を封入したCys-AG73修飾PEGリポソーム(pDNA; 3 μ g/mL)を加え、37 $^{\circ}$ C、4時間培養した。その後、無血清培地で2回洗浄し余剰のCys-AG73修飾PEGリポソームを除去した後、10% FCS含有DMEMを加えた。

(7) MSCを用いた遺伝子発現の評価

遺伝子導入したMSCを20時間培養後、PBSで2回洗浄し、Lysis Buffer (0.1% Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA)にて、細胞を溶解した。その溶解液を12000 rpm、遠心後、得られた上清を細胞抽出液とした。その抽出液を用いて、Luciferase活性測定を行った。調製した細胞抽出液を96 well ホワイトプレート (Microlite, Thermo)に添加し、ルミノメーター (LB96V, Berthold)を用い、luciferin溶液 (Promega, Luciferase Assay System) 100 μ Lを添加後の発光量を10秒間測定した。Luciferase活性は細胞抽出液中のタンパク1 mg当たりの相対発光量に換算した値であるRelative Light Unit (RLU) / mg proteinとして表記した。

(8) R8NLS ペプチドの合成

R8NLSペプチドは、invitrogenに合成を依頼した。実際に使用したR8NLSペプチドのアミノ酸配列は以下に示す通りである。(N末端)RRRRRRRRPKKKRKV (C末端)

(9) AG73 修飾 PEG-NLS リポソームの調製
pDNA/R8NLS/PEI complex (DRNPC) の調製においては、pDNAは、HEPES buffer (10 mM; pH 7.4)

に0.1 mg/mLの濃度で100 μ L調製し、N/P比に応じたR8NLSもHEPES buffer (10 mM; pH 7.4)に溶解し100 μ Lに調整した。それらを混合した後、1 mg/mLの濃度で50 μ L調製したPEIをさらに加えてvortexすることで静電的に相互作用させDRNPCとした。これを、調製した総脂質量137.5 nmolのlipid film (DOPG : DOPE : DSPE-PEG₂₀₀₀ = 2 : 9 : 0.55)に250 μ LのDRNPCを加え、10分間室温で静置し、vortexしてlipid filmを懸濁した。これをバス型ソニケーター (BRANSONIC 2510; BRANSON)を用い5分間超音波処理してリポソームを微粒子化した。リポソームとペプチドの反応部位であるマレイミド基と相互作用するCys-AG73ペプチドを混合し、室温でインキュベートした。さらに、透析用セルロースチューブを用いてリポソーム溶液の1000倍量の透析バッファー (10 mM HEPES buffer; pH 7.4)で一晩透析し、未反応のCys-AG73ペプチドを除去しAG73修飾PEG-NLSリポソームを得た。調製したリポソームは適量のHEPES buffer (10 mM; pH 7.4)を用いて希釈し、NICOMP380 ZLS (Particle Sizing Systems)を用いて粒子サイズ、 ζ 電位を測定した。

(10) 293T-Syn2細胞の調製

Syndecan-2を高発現した293T細胞(293T-Syn2細胞)は0.4 μ g/mLのpuromycin (Sigma)を含む10% FCS含有DMEM中で、air : CO₂ (95 : 5)下、37 $^{\circ}$ Cにて培養した。Sub-confluenceに達した細胞を0.25% Trypsin (GIBCO)処理によりディッシュから剥離し、10% FCS含有培地中に懸濁後、実験に使用した。

(11) バブルリポソームの調製

① リポソームの調製

基本脂質としてdipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC; 日本油脂)、DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe (日本油脂)の2種を使用し、脂質組成がDPPC : DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe = 94 : 6 (molar ratio)となるように、クロロホルム : ジイソプロピルエーテル : PBS = 1 : 1 : 1に溶解した。これをプローブ型ソニケーター (20 kHz) (ULTRASONIC PROCESSER VP-5; TAITEC)を用いて4分間超音波処理した後、ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を留去し、リポソームを得た。得られたリポソームを、Extruder (Lipex Biomembrane Inc.)を用いてpore size 0.2 μ mのpoly carbonate membrane (whatman)を通すことで粒子径を

約100-200 nmに調製した。その後 pore size 0.45 μm の cellulose acetate syringe filter (IWAKI) を用いてろ過滅菌を行ったものを実験に用いた。

②リポソームへの造影ガスの封入

調製したリポソーム (脂質濃度; 1 mg/mL) をバイアル瓶に超音波造影用ガスであるパーフルオロプロパン置換下で封入し、これをバス型ソニケーター (42 kHz) (BRANSONIC 2510; BRANSON) を用いて超音波処理し、バブルリポソームの懸濁液を調製した。

(12)AG73 修飾 PEG-NLS リポソームによる遺伝子導入

調製した 293T-Syn2 細胞を 1×10^5 cells/well となるように 48 well culture plate (IWAKI) に播種後、2 日間培養し、無血清培地で 2 回洗浄した後、FCS を含有しない DMEM に交換し、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現する pDNA (pcDNA3-Luc) を封入した AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを加え、37 $^{\circ}$ C, 4 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄し余剰の AG73 修飾 PEG リポソームを除去した後、10% FCS 含有 DMEM を加えた。

(13)st-AG73 修飾リポソームにバブルリポソームと超音波を併用した遺伝子導入

調製した MSC を 5×10^4 cells/well となるように 48 well culture plate (IWAKI) に播種後、1 日間培養し、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現する pDNA (pcDNA3-Luc) を封入した st-AG73 修飾リポソームを加え、37 $^{\circ}$ C, 4 時間培養した。その後、無血清培地で 2 回洗浄し余剰のリポソームを除去した後、調製したバブルリポソームを添加し、速やかに超音波照射プローブを well に挿入し、超音波照射 (基本条件: Frequency; 2 MHz, Intensity; 1.0 W/cm 2) (SONOPORE KTAC-3000; NEPA GENE) した。無血清培地で 2 回洗浄し、余剰のバブルリポソームを除去した後、10% FCS 含有 DMEM を加えた。

(14)293T-Syn2 細胞の遺伝子発現の評価

遺伝子導入した 293T-Syn2 細胞を 20 時間培養後、Lysis Buffer (0.1% Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA) を 100 μL 加えて細胞を溶解した。その溶解液を 12000 rpm, 遠心後、得られた上清を細胞抽出液とした。調製した細胞抽出液 20 μL を 96 well ホワイトプレート (Microplate, Thermo) に添加し、ルミノメーター (LB96V, Berthold) を

用い、luciferin 溶液 (Promega, Luciferase Assay System) 100 μL を添加後の発光量を 10 秒間測定した。Luciferase 活性は細胞抽出液中のタンパク 1 mg 当たりの相対発光量に換算した値である Relative Light Unit (RLU) / mg protein として表記した。

4. 研究成果

遺伝子を内封した AG73 ペプチド修飾リポソームを調製し、それを用いての遺伝子導入実験、さらには、遺伝子導入および発現効率の向上を目的として、核移行性ペプチドの利用、バブルリポソームと超音波照射を併用することで、AG73 修飾リポソームのエンドソームエスケープを促進し、AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効率を増強させることを試みた。

(1) ペプチド修飾リポソームの調製

AG73 ペプチドを PEG の末端に結合させたペプチド修飾リポソームを調製した。脂質には、負電荷脂質 DOPG と DOPE を用い、また、蛍光標識には、DiI を使用した。蛍光標識された種々のリポソームを MSC に添加し、その細胞相互作用を蛍光顕微鏡にて調べた。その結果、AG73 ペプチド修飾リポソームでは、比較的強い細胞相互作用が認められたのに対し、スクランブルペプチド (AG73T) を修飾したリポソームやペプチド未修飾リポソームの場合においては、ほとんど相互作用は認められなかった。このことから、AG73 ペプチド修飾リポソームの MSC への遺伝子キャリアーとしての可能性が示唆された。

(2) MSC におけるシンデカンの発現解析

ラミニン由来ペプチド AG73 のレセプターとして考えられているシンデカン 2 が、MSC に発現しているかを確認するために抗シンデカン 2 抗体を用いて、フローサイトメトリー (FACS) により解析した。その結果、中程度のシンデカン 2 発現が認められた。このことから、AG73 ペプチド修飾リポソームは、シンデカン 2 を介して MSC と相互作用することが示された。

(3) 遺伝子導入効果の in vitro 評価

上記の結果を踏まえて、AG73 ペプチド修飾リポソームに poly-L-lysine を用いてルシフェラーゼ遺伝子をコードした発現プラスミドの内封を行い、これを用いて遺伝子導入を試みた。その結果、細胞内への取り込みは、確認できたものの有意な遺伝子発現の増強は認められなかった。さらにバブルリポソームと超音波照射併用を試みたが、顕著な遺伝子

発現の増強は、認められなかった (Fig. 1A). また、効率的なリポソームの細胞内導入を期待して PEG を用いないステアリル化 AG73 修飾リポソーム (stAG73 リポソーム) の調製を行なうために、ステアリル化 AG73 ペプチドを用いて、リポソームの表面に直接 AG73 を修飾させたステアリル化 AG73 修飾リポソーム (stAG73 リポソーム) の調製を試み、MSC への遺伝子導入実験を行った。しかしながら、バブルリポソームと超音波照射併用を行っても、顕著な遺伝子発現の増強は認められなかった (Fig. 1B).

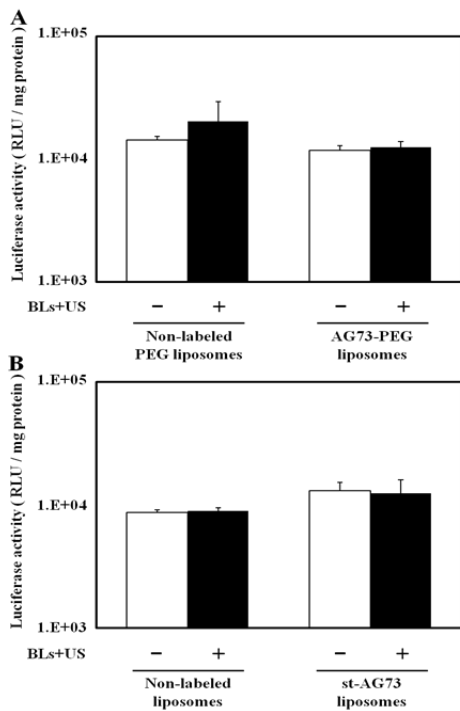


Fig. 1. Effect of BLs and US on gene transfection by AG73-modified liposomes.

MSC were treated with non-labeled, AG73-PEG liposomes (pDNA; 3 μ g/mL) for 4 h at 37°C(A). MSC were treated with non-labeled, st-AG73 liposomes (pDNA; 3 μ g/mL) for 4 h at 37°C(B). After incubation, the cells were washed and BLs were added. The cells were exposed to US (Frequency: 2028 kHz, Intensity: 1.0 W/cm²) and cultured for 2days and then luciferase activity was determined. Data are shown as means \pm SD (n = 4).

(4) AG73 修飾リポソームの開発に成功し、リポソームを選択的に目的とする細胞へ送達し、高い遺伝子導入効果を有することを報告してきた。さらに、超音波造影ガスを封入したリポソームであるバブルリポソームと超音波照射を併用することで、AG73 修飾リポソームのエンドソームエスケープを促進し、AG73 修飾リポソームの遺伝子導入効率を増強させることを明らかとしている。しかし、

バブルリポソームと超音波照射の併用により、細胞内へ放出された導入遺伝子は、細胞内での挙動が制御されていない。そのため、導入遺伝子を効率的に核へと移行させることができれば、さらなる遺伝子導入効率の亢進が期待される。そこで、核移行シグナル (NLS) ペプチドの配列にアルギニンを 8 つ結合させた R8 ペプチドを修飾し、R8NLS とすることで、pDNA と安定的に複合体を形成させ、それをリポソームに内封した AG73 修飾 PEG-NLS リポソームの作製を試み、遺伝子導入効率をさらに増強可能であるか検討した。はじめにレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現する pDNA と NL の複合体をリポソームに封入し、PEG 鎖の末端に AG73 ペプチドを修飾した AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを調製した。また、AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを用いて 293T-Syn2 細胞に対し遺伝子導入を行い、遺伝子導入効率を評価した。AG73 修飾 PEG-NLS リポソームの平均粒子サイズは約 180 nm、 ζ 電位が約 +2 mV であった。また、AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを用いた遺伝子導入では、293T-Syn2 細胞において、有意なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた (Fig. 2).

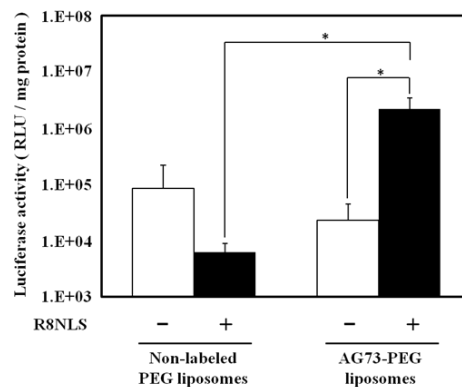


Fig. 2. Effect of gene transfection by AG73-PEG-NLS liposomes.

293T-Syn2 cells were treated with non-labeled, AG73-PEG-NLS liposomes (pDNA; 3 μ g/mL) for 4 h at 37°C. The cells cultured for 20 h and then luciferase activity was determined. Data are shown as means \pm SD (n = 4). * p <0.05.

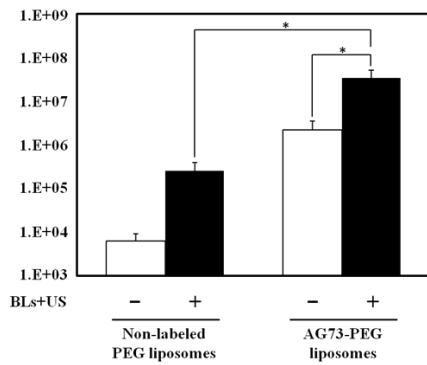


Fig. 3. Effect of BLs and US on gene transfection by AG73-PEG-NLS liposomes.

293T-Syn2 cells were treated with non-labeled, AG73-PEG-NLS liposomes (pDNA; 3 µg/mL) for 4 h at 37°C. After incubation, the cells were washed and BLs (120 µg/mL) were added. The cells were exposed to US (Frequency: 2028 kHz, Intensity: 1.0 W/cm²) and cultured for 20 h and then luciferase activity was determined. Data are shown as means ± SD (n = 4). *p < 0.05.

(5) AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを用いた, 293T-Syn2 細胞への遺伝子導入に, バブルリポソームと超音波照射を併用し, 遺伝子導入効率の増強が可能であるか検討した. 293T-Syn2 細胞において, AG73 修飾 PEG-NLS リポソームを用いた遺伝子導入では, バブルリポソームと超音波照射の併用を行なうことで有意な遺伝子導入効率の亢進が認められた (Fig. 3).

以上の検討から, AG73 修飾 PEG-NLS リポソームによる遺伝子導入法において, NLS が pDNA の細胞内挙動に影響を与えることで, 核への遺伝子送達効率が高まり, その結果として遺伝子発現が促進できることが明らかとなったことから, AG73 修飾 PEG-NLS リポソームは, 有用な遺伝子導入ツールになりうることを期待された.

以上より, 従来の AG73 修飾リポソームでは, MSC に対し, 優れた遺伝子導入効果を示すことは難しく, 他のペプチドを修飾しても, その導入効果は安定しないことを確認した. また, 核移行シグナルペプチドを用いた AG73 修飾リポソームの作製に成功し, 293T-Syn2 細胞に対し, 優れた遺伝子導入効果が認められた. その遺伝子導入効率はバブルリポソームと超音波照射の併用により増強が可能であることも示された.

MSC への効率的な遺伝子導入を果たすためには, MSC への遺伝子取り込みの増大だけでなく, 導入遺伝子の細胞内制御も重要であると考えられる. 本研究において開発された AG73 修飾 PEG-NLS リポソームは, AG73 ペプ

チドによる細胞への親和性の増大と NLS による導入遺伝子の核への移行を制御できるという点で MSC を用いた *ex vivo* 遺伝子細胞療法を行うための有用なツールとして, 期待された. 今後は, 本遺伝子導入ツールを用いて, MSC への効率的な遺伝子導入システムの構築に繋げていきたい.

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)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 鈴木健太郎, 根岸洋一, 高橋葉子, 高橋良太, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, バブルリポソーム併用超音波遺伝子導入法を用いた間葉系幹細胞への遺伝子導入効果の解析, 日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 28 日, 静岡)
- (2) 根井彰浩, 根岸洋一, 高橋佐慧子, 小俣大樹, 鈴木 亮, 丸山一雄, 野水基義, 新槇幸彦, 核移行シグナルペプチド内封 AG73 修飾リポソームによる新規遺伝子デリバリーツールの開発, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012 (2012 年 9 月 25 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 洋一 (NEGISHI YOICHI)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50286978

(2) 研究分担者

新槇 幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90138959

高橋 葉子 (TAKAHASHI YOKO)
(遠藤 葉子)
東京薬科大学・薬学部・助手
研究者番号: 30453806

(3) 連携研究者

高木 教夫 (TAKAGI NORIO)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50318193

丸山 一雄 (MARUYAMA KAZUO)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号: 30130040