

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15250

研究課題名（和文）in vivoでの抗体の細胞内送達を指向した細胞質送達ペプチドの新機軸

研究課題名（英文）Novel innovations in cytoplasmic delivery peptides directed at intracellular delivery of antibodies

研究代表者

川口 祥正（Kawaguchi, Yoshimasa）

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90936808

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、mastoparan Xを鋳型に、安全マージンが広く、高効率に細胞質送達可能なE3MPH16を開発した。E3MPH16によって抗Ras抗体をHT1080細胞に導入することで、増殖抑制効果を示した。さらに、担癌モデルマウスに対して、NLS-EGFPとE3MPH16を局所投与することで、一部の細胞においてNLS-EGFPを細胞質に送達可能であることがわかった。また、細胞質送達ペプチドであるL17ER4と抗体とのコンジュゲートの調製も検討した。sortaseによる酵素化学的手法によって、コンジュゲートを調製することで、凝集することなく、細胞質に抗体を送達可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したE3MPH16は低毒性かつ高効率で高分子を細胞質に送達可能なペプチドであることから、機能性高分子の細胞質送達に有用であると考えられる。また、in vivoでも送達可能であったことから、今後、抗体の細胞質送達による細胞機能制御への展開が期待される。また、L17E4と抗体のコンジュゲート設計を達成したことから、このコンジュゲーション方法を様々なペプチドに応用することで、より効率的な抗体の細胞質送達につながるとともに、in vivoでのデリバリーにおける基盤技術になると考えられ、今後、創薬研究への実践的取り組みにつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed E3MPH16, which has a wide safety margin and highly efficient cytosolic delivery derived from mastoparan X, and showed that anti-Ras antibody delivered by E3MPH16 into HT1080 cells inhibited their growth. Furthermore, topical administration of NLS-EGFP and E3MPH16 to tumor-bearing mice showed that NLS-EGFP could be delivered to the cytosol in some cells. We also examined the preparation of conjugates of L17ER4, an intracellular delivery peptide, with antibodies. We showed that the conjugates could be prepared by the enzyme-chemical method using sortase, and the antibodies could be delivered to the cytosol without aggregation. The application of the conjugation method to various peptides will lead to more efficient cytosolic delivery of antibodies and will be a fundamental technology in vivo delivery, and it is expected to lead to practical drug discovery research efforts in the future.

研究分野：創薬化学

キーワード：ペプチド 抗体 細胞内送達 細胞質 膜傷害性ペプチド コンジュゲート エンドサイトーシス エンドソーム脱出

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内にはタンパク質相互作用や天然変性タンパク質など undruggable な創薬標的が数多く存在しており、それらを制御し治療するための創薬モダリティは十分ではない。それに対して、抗体は、優れた抗原認識能を有しており、タンパク質-タンパク質間相互作用など高難度な標的も制御可能である。しかし、細胞膜透過性が乏しいため、現在上市されている抗体医薬の標的は細胞外分子に限定されており、細胞内分子を標的としたものは未だない。したがって、in vivo 応用可能な細胞質送達技術の開発が切望されている。これまで、リポソームやポリマーなどのナノキャリアや細胞質送達ペプチドによって抗体の細胞内送達が検討されているものの、そのほとんどが培養細胞での検討であり、in vivo で活用する上では、細胞毒性と低い導入効率、細胞標的化などの問題点が残されている。

これまで、研究代表者は、クモ毒由来の膜傷害性ペプチドである M-Lycotoxin にグルタミン酸を導入することで、細胞毒性を低減して、高効率に抗体を細胞質に送達可能な細胞質送達ペプチド“L17E”の創製に成功している。しかし、L17E は抗体と混合することで細胞質に抗体を送達するためのペプチドであることから、体内動態がペプチドと抗体と異なり、in vivo での活用は阻まれていた。また、抗体送達に必要なペプチド濃度と細胞毒性が発現する濃度が近く安全性に課題があった。よって、in vivo において抗体を高難度標的タンパク質の存在する細胞質に安全で効率的に送達するための新たな細胞質送達ペプチドの創製が必要である。

2. 研究の目的

in vivo に展開可能な抗体の細胞内送達ペプチドの開発を目的にした。具体的には、1) 安全で高効率に送達可能な新規細胞質送達ペプチドの開発、2) 抗体と細胞質送達ペプチドのコンジュゲートの分子設計の最適化を試みた。

3. 研究の方法

(1-1) 膜傷害性低減ペプチドの細胞内取り込み促進

膜傷害性ペプチドに対して細胞毒性低減のためのグルタミン酸と各種標的化配列や細胞内取り込み促進配列を結合させたペプチドを Fmoc 固相合成法によって合成した。これらのペプチドにおいて細胞毒性を評価し、毒性が低減されたペプチドを選抜した。選抜したペプチドの蛍光標識体を合成し、フローサイトメトリーによってペプチドの細胞内取り込み量を評価した。

(1-2) ペプチドによる高分子の細胞質送達

毒性なく取り込み促進効果が確認されたペプチドにおいて、モデル高分子である Alexa488 標識された 10 kDa Dextran(Dex10-Alexa488)と混合し、細胞に処理した後に共焦点顕微鏡によって細胞を観察することで、細胞質送達効率を評価した。

(1-3) 細胞質送達メカニズムの解析

各種エンドサイトーシス阻害剤を処理した細胞に対して、蛍光標識したペプチドを添加し、フローサイトメトリーによってペプチドの細胞内取り込み量を評価した。さらに、ペプチドと Dex10-Alexa488 を処理して、顕微鏡で観察することで、細胞質送達効率を評価した。

(1-4) 機能性タンパク質の細胞内送達

Cre recombinase によって遺伝子組換えが生じると EGFP が発現する細胞に対して、Cre recombinase をペプチドによって導入し、EGFP の発現をフローサイトメトリーで評価し、組換え効率を算出した。抗体の細胞内導入については、免疫染色および機能評価の 2 つの系によって評価した。まず、Ras-EGFP を発現させた細胞に対して、anti-GFP-IgG をペプチドによって導入し、細胞を固定化、膜透過処理後に蛍光標識された 2 次抗体によって処理し、共焦点顕微鏡によって、標的である EGFP と抗体の共局在を観察した。また、機能評価については、Ras 阻害による抗腫瘍効果によって評価した。HT1080 細胞において Ras が増殖に大きく寄与していることがわかっている。anti-Ras-IgG をペプチドによって HT1080 細胞に導入し、細胞増殖抑制効果を評価した。

(1-5) NLS-EGFP の in vivo デリバリー

Colon-26 細胞をマウスに移植した担癌モデルマウスに対して、E3MPH16 と NLS-EGFP をガン組織に対して局所投与して、24 時間後に解剖し、凍結切片を作製し、共焦点顕微鏡で観察した。

(2-1) ペプチドとタンパク質のコンジュゲート調製

ペプチド転移酵素である sortase A を大腸菌より調製した。モデルタンパク質として核移行シグナルを融合させた緑色蛍光タンパク質(NLS-EGFP)の C 末端に sortase A 認識配列を付与した NLS-EGFP-srt を大腸菌より調製した。さらに、anti-GFP-IgG の C 末端に sortase 認識タグを付与した anti-GFP-IgG-srt を細胞から調製した。また、細胞内送達ペプチドの N 末端および C 末端のリシ

ン側鎖に sortase A による転移反応に必要なポリグリシン配列を結合させたペプチド、またポリグリシンを細胞質送達ペプチドの N 末端アミノ基に付与したペプチドを合成した。これらのタンパク質とペプチドを sortase によってライゲーションすることで、ペプチド-タンパク質コンジュゲートを調製した。

(2-2) NLS-EGFP と細胞質送達ペプチドとのコンジュゲートの細胞質送達

モデルタンパク質 NLS-EGFP と細胞質送達ペプチドのコンジュゲートを細胞に処理し、共焦点顕微鏡によって観察し、送達効率を評価することで、コンジュゲートの分子設計を最適化した。

(2-3) anti-GFP-IgG と細胞質送達ペプチドとのコンジュゲートの細胞質送達

anti-GFP-IgG と細胞質送達ペプチドのコンジュゲートを EGFP-actin を発現させた細胞に処理し、免疫染色した後に、共焦点顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

(1) 安全で高効率に高分子を細胞質送達可能な E3MPH16 の開発

これまで膜傷害性ペプチドである mastoparan X (MP) の N 末端に 3 つのグルタミン酸を修飾することで (E3MP)、細胞毒性を低減できることがわかってきた。E3MP に対して、様々な細胞標的化配列および細胞内取込み促進配列を付与し、細胞毒性を評価したところ、細胞内取込み促進配列であるポリヒスチジン (H16) を C 末端に付与した E3MPH16 において、100 μ M においても細胞毒性が見られなかった。E3MPH16 に蛍光修飾し、細胞内取込みを評価したところ、E3MP と比較して、40 倍もの細胞内取込みが確認された。次に、10 μ M の E3MPH16 と Dex10-Alexa488 を混合し、HT1080 細胞に添加し、共焦点顕微鏡によって細胞を観察したところ、100% の細胞に Dex10-Alexa488 が送達されていることが明らかとなった。次に、細胞質送達メカニズムを明らかにするために、エンドサイトーシス阻害剤で処理した細胞に対して蛍光標識されたペプチドを処理し、フローサイトメトリーで細胞内取込みを評価したところ、マクロピノサイトーシスおよびカベオラ依存性エンドサイトーシスによってペプチドが細胞内に取込まれることが示された。さらに、ペプチドと Dex10-Alexa488 をエンドサイトーシス阻害剤で処理した細胞に添加し、共焦点顕微鏡で観察したところ、ペプチドの取込みと同様にマクロピノサイトーシス阻害剤およびカベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤によって細胞質送達が阻害されたことから、これらのエンドサイトーシスが細胞質送達に寄与していることが示された。

実際に、E3MPH16 によって、機能性高分子を細胞質に送達できるかどうかを評価した。Cre recombinase と E3MPH16、loxP 配列を持つ細胞に細胞質送達したところ、30% 以上の細胞で遺伝子組換えが起きたことを確認した。さらに、抗体を細胞質送達できるかどうかについて、Ras を標的とした抗体を用いて検討を行った。Ras は各種がん細胞で変異が生じており、がんの増殖に関与している細胞内の疾患原因タンパク質であり、低分子で制御することが難しいとされている。E3MPH16 と anti-Ras-IgG を TH1080 細胞に添加して、24 時間後の細胞増殖阻害を評価したところ、約 20% の増殖抑制効果が確認された。よって、E3MPH16 によって、抗体を細胞質に送達し機能を発揮させることに成功した。

最後に、E3MPH16 が *in vivo* においてもタンパク質を細胞質送達可能かどうかについて、担癌モデルマウスを用いて検討した。E3MPH16 と NLS-EGFP を混合し、がん組織に局所投与し、切片を観察したところ、一部の細胞において、核染色された Hoechst の蛍光シグナルと EGFP の蛍光シグナルが共局在することがわかった。よって、E3MPH16 は *in vivo* においても局所投与によって細胞質送達可能であることが示唆された。今後は、E3MPH16 と抗体とのコンジュゲートを設計し、*in vivo* での細胞機能制御について検討を進める予定である。

(2) 細胞質送達ペプチド-タンパク質コンジュゲートの分子設計の最適化と抗体送達

これまでに、L17E の C 末端に 4 つのアルギニンを導入し、細胞内移行能を高めた改変ペプチド (L17ER4) が開発され、Cre recombinase (38 kDa) の C 末端に遺伝子工学的に融合させ、大腸菌から発現・精製された Cre-L17ER4 によって、*in vivo* での遺伝子組換えが達成された。その一方、遺伝子工学的手法には、L17ER4 配列の付与がカーゴタンパク質の発現・精製に大きく影響し、凝集する傾向があることが知られており、IgG とのコンジュゲートは達成されていない。さらに、大腸菌の翻訳システムに依存するため非天然アミノ酸を含む化学合成したペプチドを導入できない。そこで、本研究では、上記の課題を解決するために、ペプチド転移酵素である Sortase A を用いたコンジュゲート法を利用することで、オンデマンドにライゲーションすることで物性への影響を解決するとともに、コンジュゲートの分子設計を最適化した。

L17ER4 に対して N 末端へのタンパク質のコンジュゲーションのみ評価されていたため、C 末端へのコンジュゲーションを検討するために、L17ER4 の N 末端および C 末端に対してタンパク質を Sortase A を用いてライゲーションするためのペプチド設計および合成を行なった。L17ER4 の N 末端もしくは C 末端に 4-methyltrityl (MTT) 保護されたリシンを Fmoc 固相合成法によって導入し、MTT を選択的脱保護したのち、sortase 転移反応に必要なポリグリシンを固相合成によって導入した分岐型のペプチドを合成した。また、R4 の結合位置も検討されていなかったため、R4L17E についても同様に合成を行なった。次に、モデルカーゴタンパク質として NLS-EGFP の C 末端に sortase 認識配列を導入した NLS-EGFP-srt を大腸菌から調製し、化学

合成された細胞内送達ペプチドと sortase によってライゲーションした。また、遺伝子工学的に L17ER4 を NLS-EGFP に融合し、大腸菌から調製したコンジュゲートをコントロールとした。それぞれのペプチドにおいて、sortase によって約 50%の効率でコンジュゲートが形成されることがわかった。また、これらのコンジュゲートを Native-PAGE により分析したところ、遺伝子工学的に L17ER4 を NLS-EGFP に融合し、大腸菌から調製した場合は、凝集する傾向があることが示された一方で、sortase によって調製されたコンジュゲートは凝集していないことが明らかとなった。よって、sortase によって on demand にコンジュゲートを調製することで物性を制御し、凝集を抑制できることが示唆された。

次に、これらのコンジュゲートを細胞に処理したところ、L17ER4 の N 末端に NLS-EGFP を導入したサンプルにおいて、約 40%の細胞において、各マーカーである Hoechst と EGFP の蛍光シグナルが共局在することがわかり、最も送達効率が高いことが明らかとなった。さらに、タンパク質とライゲーションするためのリンカー配列を最適化するために、L17E の N 末端にポリグリシンリンカーを導入した直鎖型のペプチドを合成した。これらのペプチドに対して sortase によって NLS-EGFP-srt をライゲーションし、細胞に投与したところ、直鎖型にポリグリシンを L17ER4 の N 末端に結合させたペプチドにおいて 50%を超える細胞で細胞質送達されることが確認された。よって、このペプチドがコンジュゲートにおいて最も最適であることが示唆された。

次に、抗体が本手法によって細胞質送達されるかどうか検討を行なった。EGFP に対する抗体 (anti-GFP-IgG) に対して sortase 認識配列を導入した anti-GFP-IgG-srt を細胞から調製した。anti-GFP-IgG-srt に対して、上記で最適化した直鎖型のペプチドを sortase によって、導入した anti-GFP-IgG-LN-L17ER4-N を調製した。まずは、このコンジュゲート体において、抗体の抗原認識能を維持しているかどうか EGFP-actin を一過的に発現させた細胞を用いて免疫染色によって確認した。遺伝子工学的に anti-GFP-IgG の重鎖の C 末端に L17ER4 を導入した場合は、細胞膜表面に非特異的に結合したのに対して、sortase によって融合した anti-GFP-IgG-LN-L17ER4-N では抗原である EGFP-actin との共局在が観察された。よって、実際に L17ER4 とのコンジュゲートによって抗体を細胞質に送達できるかどうか検討を行なった。in vivo での利用を見据えて、代謝安定性の高い D 体のアミノ酸からなる D-L17ER4 も合成し、anti-GFP-IgG-srt と sortase によってライゲーションさせた。これらのコンジュゲートを細胞に添加して、1 時間後に細胞を固定、膜透過処理して免疫染色によって観察したところ、L 体および D 体の L17ER4 コンジュゲートにおいて標的である EGFP-actin との共局在が観察された。よって、sortase による抗体と L17ER4 のコンジュゲートによって、抗体を細胞質送達可能であることが示された。今後、機能性抗体とのコンジュゲートを調製することで、in vivo での薬効評価など創薬研究への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura Kayo, Kawano Kenichi, Kawaguchi Yoshimasa, Kawamura Yuki, Michibata Junya, Kuwata Keiko, Sugiyama Koji, Kusumoto Kenji, Futaki Shiroh	4. 巻 5
2. 論文標題 Hemopexin as a Potential Binding Partner of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides in Serum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Pharmacology & Translational Science	6. 最初と最後の頁 603 ~ 615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acspsci.2c00043	査読の有無 有
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 Okano Syusuke, Kawaguchi Yoshimasa, Kawano Kenichi, Hirose Hisaaki, Imanishi Miki, Futaki Shiroh	4. 巻 72
2. 論文標題 Split luciferase-based estimation of cytosolic cargo concentration delivered intracellularly via attenuated cationic amphiphilic lytic peptides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128875 ~ 128875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2022.128875	査読の有無 有
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 Nishimura Motoki, Kawaguchi Yoshimasa, Kuroki Kakeru, Nakagawa Yuna, Masuda Toshihiro, Sakai Takayuki, Kawano Kenichi, Hirose Hisaaki, Imanishi Miki, Takatani Nakase Tomoka, Afonin Sergii, Ulrich Anne S., Futaki Shiroh	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural Dissection of Epsin 1 N Terminal Helical Peptide: The Role of Hydrophobic Residues in Modulating Membrane Curvature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202300129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.202300129	査読の有無 有
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 Hirai Yusuke, Kawaguchi Yoshimasa, Kasahara Chisato, Hirose Hisaaki, Futaki Shiroh	4. 巻 21
2. 論文標題 Liquid Droplet-Mediated Formulation of Lipid Nanoparticles Encapsulating Immunoglobulin G for Cytosolic Delivery	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1653 ~ 1661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00868	査読の有無 有
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 Kawaguchi Yoshimasa, Kawamura Yuki, Hirose Hisaaki, Kiyokawa Megumi, Hirate Momo, Hirata Tsuyoshi, Higuchi Yuriko, Futaki Shiroh	4. 巻 367
2. 論文標題 E3MPH16: An efficient endosomolytic peptide for intracellular protein delivery	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 877 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2024.01.067	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshimasa Kawaguchi, Naoki Tamemoto, Masataka Fumoto, Shiroh Futaki
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF MELITTIN DELIVATIVES FOR INTRACELLULAR DELIVERY OF BIOMACROMOLECULES
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口祥正、為本尚樹、麗昌高、二木史朗
2. 発表標題 生理活性物質の細胞内送達に向けたMelittin誘導体の創製
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗山理志, 広瀬久昭, 川口祥正, 二木史朗
2. 発表標題 ペプチドによる細胞内送達の効率と遺伝子発現の相関解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川優奈, 川口祥正, 橋口隆生, 二木史朗
2. 発表標題 SARS-CoV-2S protein搭載による細胞外小胞の膜融合促進
3. 学会等名 第44回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshimasa Kawaguchi
2. 発表標題 Development of cytosolic delivery peptides by attenuated membrane lytic activity
3. 学会等名 第61 回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Uehata, Yoshimasa Kawaguchi, Naoki Tamemoto, Shiroh Futaki
2. 発表標題 Elucidation of the cellular delivery mechanism of melittin derivatives
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshimasa Kawaguchi
2. 発表標題 Development of a Novel Endosomolytic Peptide for Cytosolic Delivery of Proteins
3. 学会等名 第60 回ペプチド討論会サテライトシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺田 旺之、川口 祥正、二木 史朗
2. 発表標題 抗体の細胞質送達に向けた抗体-L17ER4コンジュゲートの創製
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川口祥正、川村優貴、清川めぐみ、広瀬 久昭、樋口 ゆり子、二木 史朗
2. 発表標題 低毒性かつ高効率な新規高分子細胞質送達ペプチドの創製
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中川優奈、川口祥正、広瀬久昭、橋口隆生、二木史朗
2. 発表標題 SARS-CoV-2 Spike Protein搭載細胞外小胞による細胞選択的かつ高効率な細胞内送達
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yoshimasa Kawaguchi
2. 発表標題 Attenuated cationic lytic peptides for intracellular delivery of antibodies
3. 学会等名 pre-ISBC2024 symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 薬物送達組成物	発明者 二木史朗、平井勇 祐、広瀬久昭、川口 祥正	権利者 国立研究開発法 人科学技術振興 機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-031510	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞質送達ペプチド	発明者 川口祥正、二木史朗	権利者 国立大学法人京 都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-174558	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂質ナノ粒子、医薬組成物、および脂質ナノ粒子の製造方法	発明者 二木史朗、平井勇 祐、川口祥正、広瀬 久昭、笠原千聖	権利者 国立研究開発法 人科学技術振興 機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2024/8154	出願年 2024年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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 協力 者	樋口 ゆり子 (Higuchi Yuriko)	京都大学大学院・薬学研究科・教授 (14301)	

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
---------	---------