

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24241074

研究課題名(和文) RNAの造形力を利用した医薬品探索

研究課題名(英文) Drug discovery driven by structural plasticity of RNA

研究代表者

中村 義一 (Nakamura, Yoshikazu)

東京大学・医科学研究所・名誉教授

研究者番号：40114590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はRNAの造形力を利用した医薬品探索を目的としたもので、SELEX(人工進化)技術を用いてMidkine, Autotaxin, FGF2等の創薬標的タンパク質に結合するRNA分子(アプタマーという)を創成し、*in vitro*(細胞)試験でそれらの特性を明らかにし、*in vivo*(動物)試験で癌・線維症・骨疾患等の適応疾患に対する薬効を確認した。このうち、Autotaxin・アプタマー複合体のX線結晶構造を2.0オングストロームの解像度で明らかにすることに成功し、アプタマーの阻害機序を原始レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aptamer is a folded single-stranded nucleic acid that binds given molecules. The concept is based on the ability of short (20-80 mer) sequences to fold, in the presence of a target, into unique three-dimensional structures, which allow the aptamer to bind target molecules with high affinity and specificity. In this study, we developed several RNA and/or DNA aptamers by SELEX method to therapeutic target proteins such as Midkine, Autotaxin and FGF2. The therapeutic potency of these aptamers for cancer, fibrosis and bone diseases, respectively, was confirmed in the *in vitro* (cell-based) and *in vivo* (animal-based) studies. In collaboration with O. Nureki's group of The University of Tokyo, we solved the crystal structure of Autotaxin complexed with the aptamer at the 2.0 angstrom resolution, uncovering the inhibitory mechanism and the structure-function relationship.

研究分野：RNA医科学

キーワード：アプタマー SELEX 核酸医薬 創薬標的 アンタゴニスト アゴニスト RNA造形力 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

RNA 研究は近年飛躍的に進展し、RNA の機能や機能性マテリアルとしての学術創成あるいは産業応用に関する豊かな未来が期待される。我々の発見した翻訳因子による tRNA 分子の擬態は、遺伝暗号解読に残された最後の難問であった、終止コドン解読のメカニズム解明という基本問題の解決に貢献したが、同時にタンパク質と RNA の分子擬態という生物学の新しい概念を提出した(文献)。この発見は、RNA が単に一次配列や配列相補性に依存して働くだけでなく、タンパク質と同レベルの個性ある立体構造を形成して機能する高分子マテリアルとしてのポテンシャルを強く示唆するものである。この RNA の造形力を利用すれば新たな医薬品開発に道を拓き、RNA の造形力という新しいサイエンスの振興に役立つものと期待される。

<引用文献>

Ito et al. Nature, 403: 680-684 (2000).

2. 研究の目的

RNA には多様な「かたち」を創る「造形力」が備わっている。本研究では、SELEX (人工進化) 技術を用いて RNA の優れた造形力を発掘し、各種の標的分子を特異的に認識・結合する RNA 分子 (アプタマーという) を創製。それらを用いたアプタマー医薬品開発の技術基盤を確立する。同時に、RNA 造形力に関する構造生物学的研究を行う。

3. 研究の方法

アプタマーは SELEX 法とよぶ試験管内進化法によって創製する。これは、いわば、「魚釣り」のようなもの。始めに 4 種類の塩基 (AUGC) のランダム配列の RNA プールを作製し (10^{14} 数の chemical library)、このプールに標的となるタンパク質を「餌」にして、結合する RNA を釣り上げ、これを増幅して 2 回目のプールを作製、釣りを繰り返す。このサイクルを 10 数回行うことによって、最終的に標的タンパク質に強く特異的に結合するアプタマーを創製することができる。

本研究では、Midkine、Autotaxin (ATX)、FGF2 (線維芽細胞増殖因子 2) に対するアプタマーを創製し、それらの生化学的、物理化学的、細胞生物学的な解析を行うとともに、動物の疾患モデルを用いた薬効試験を実施した。さらに、抗 ATX アプタマーに関しては ATX との複合体の X 線結晶構造解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 抗 Midkine アプタマーの創製と機能研究

Midkine (MK) は神経芽腫に特異的な因子として分離されたが、その後の研究により、増殖因子として各種の免疫応答や細胞応答に関与することが明らかになった。我々が先行研究において創製した抗 MK アプタマーは免疫系 Treg 細胞を亢進させ、多発性硬化症モ

デルマウスで発症を抑制する作用を示したが(文献)、神経芽腫細胞の増殖には何ら影響しなかった。これに対して、本研究で創製した抗 MK アプタマーは免疫系に対する作用はないものの、神経芽腫の増殖を顕著に抑制することが、in vitro 細胞試験と in vivo (xenograft) マウス試験によって明らかになった(文献)。現在、本アプタマーの神経芽腫小児癌に対する適応の可能性について名古屋大学医学部門松教授らと共同研究を進めている。

2 種類の抗 MK アプタマーの作用機序の違いを明らかにする目的で NMR chemical shift perturbation 解析を実施した(理研の NMR 研究グループとの共同研究)。その結果、前者の多発性硬化症に薬効をもつアプタマーは、MK タンパク質の全領域で強いシグナルの変化が観察されたが、後者の神経芽腫特異的なアプタマーによるシグナルの変化は MK タンパク質 N ドメインに局限することが明らかになった。この結果から、アプタマーの作用機序の違いは結合部位の違いに起因するものと考えられる。

(2) 抗 ATX アプタマーの創製と機能研究

炎症は生体のもつ治癒反応であるが、様々な要因によって、慢性的あるいは難治性の疾患へと増悪する。Autotaxin (ATX) が産生する LPA (リゾリン脂質の一種) は生体の恒常性の維持や発生・分化において重要な機能をもつことが知られているが、ATX や LPA の亢進は難治性炎症である特発性肺線維症 (IPF) や疼痛の発症に関与することが指摘されている。

本研究で創製した抗 ATX アプタマーは 29 鎖長で高度な最適化・修飾加工が完了し、RNA 分解耐性で、picomolar レベルの Kd (解離常数) と IC50 (酵素反応阻害) 値をもつ。肺線維症の動物モデルとして、ブレオマイシン (BLM) を点鼻投与して肺の線維化を誘発したマウスモデルで、アプタマーの点鼻投与の効果を試験した。その結果、BLM 投与と同時にアプタマーを継続投与した場合に、線維化のマーカーとなる気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のコラーゲンの蓄積が顕著に抑制され、肺の病理切片の線維化スコアも改善することが確認された(予防効果)。また、BLM 投与による線維化誘発後のアプタマーの「後投与」によっても肺の線維化を改善することも明らかになった(治療効果)(文献)。

皮膚の線維症である強皮症モデルでの薬効試験も実施した。BLM の皮下投与によりマウスに局所的な皮膚の線維化を誘発し、アプタマーの持続的な皮下投与(ポンプ使用)による効果を調べた。その結果、アプタマーによる皮膚線維化抑制作用が皮膚の病理切片観察から確認された。

ATX が産生する LPA は重要な脂質メディエーターであるため、これまで低分子を中心とする LPA ブロッカーの開発が世界的に大手製

薬企業で行われてきた。しかし、いずれも副作用等のため開発がドロップしてきた。近年、ATX 自身に対する低分子創薬も開始されたが、抗体の開発には至っていない。本研究で創製した抗 ATX アプタマーを用いて、難治性炎症疾患である IPF に対する革新的な治療薬の開発を実現したい。

(3) 抗 ATX アプタマーの構造生物学的研究

これまでに抗 ATX アプタマーとしては、RNA アプタマーと DNA アプタマーを創製し、それらと ATX タンパク質との共結晶の X 線構造解析を行った（東京大学理学系研究科の瀧木理教授のグループとの共同研究）。その結果、DNA アプタマー・ATX 複合体の結晶構造を 2.0 Å の解像度で明らかにすることに成功した（図 1）。アプタマーは ATX タンパク質の触媒ドメインの基質結合ポケットに結合して、基質となる LPC のエントリーをブロックする阻害機序が明らかになった。さらに、アプタマーと ATX の結合領域に関する詳細な構造情報をもとに、アプタマーの修飾改変を実施して、ATX 酵素阻害活性を向上させることにも成功した（文献）。

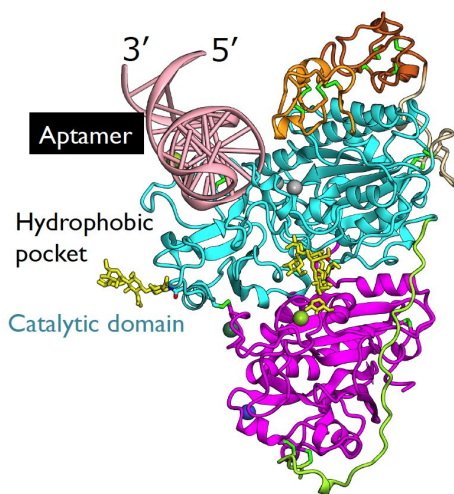


図1. アプタマーとAutotaxin (ATX)の複合体の2Å結晶構造。アプタマーがATXの触媒ドメインの基質結合ポケットの入り口に結合し、LPCの結合を阻害。

(4) 抗 FGF2 アプタマーの創製と機能研究

FGF2 は組織の修復や発生等に重要な働きをもつ増殖因子で健康な生体では「善玉」タンパク質と考えられている。その一方で、細胞レベルの研究によって、FGF2 の発現や機能の亢進が骨疾患の増悪に加担する可能性が指摘されていた。しかし、FGF2 の発見から 40 年経過するにも係らず、抗体や低分子を含めて、FGF2 に対する十分な阻害剤が開発されてこなかった。そのため、骨疾患における FGF2 の機能は不明であり、骨疾患に対する FGF2 阻害剤の利用についても何らの知見もなかった。

本研究ではアプタマーの特徴を生かして

FGF2 に対する特異的かつ強力な阻害作用をもつ抗 FGF2 アプタマーを創製し、その特性を表面プラズモン共鳴解析と細胞を用いた *in vitro* 解析により明らかにした上で、各種の動物モデル試験によって医薬品としての potency を解析した。

本アプタマーは 36 鎖長で高度加工が完了し、RNA 分解耐性ととも、picomolar レベルの Kd (解離常数)と IC50 (酵素反応阻害)値をもつ。リウマチと骨粗鬆症の動物(マウス・ラット)モデルでアプタマー投与による顕著な骨破壊の抑制効果を確認するとともに(図 2)、これら病態における成長軟骨層(epiphyseal cartilage)の減衰をアプタマーが劇的に回復させる作用を持つことを見いだした。この発見は、本アプタマーが四肢短縮による低身長を主な症状とする軟骨無形成症(Achondroplasia、難病指定の希少疾患)に対する新薬としての可能性を示唆するものである。また、本アプタマーは骨疾患に伴う痛み、特に癌性疼痛のマウスモデルで、モルヒネと同等な顕著な鎮痛作用をもつことも明らかになった。

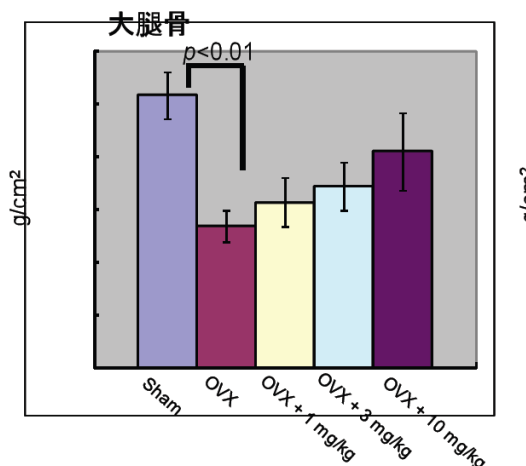


図2. ラット骨粗鬆症(OVX)モデルでの骨密度減少に対するFGF2アプタマーの抑制作用。メスラットの卵巣を摘出後、隔日3容量のアプタマーを腹腔投与し、90日目で大腿骨の骨密度をDEXA装置を用いて測定した。アプタマー非投与群では骨密度が半減するが、アプタマーは容量依存的に減少を抑制できる。

<引用文献>

- Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 3915-3920 (2008).
 Kishida et al. Cancer Res., 73: 1318-1327 (2013).
 Kato et al. Nature Struct. Mol. Biol., 23: 395-401 (2016).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

- Kato, K., Ikeda, H., Miyakawa, S., Futakawa, S., Nonaka, Y., Fujiwara, M., Aoki, J., Morita, J., Ishitani, R., Nishimasu, H., Nakamura, Y., Nureki,

- O.: Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 23: 395-401 (2016). 査読有り
doi: 10.1038/nsmb.3200
- Kashima, I., Takahashi, M., Hashimoto, Y., Sakota, E., Nakamura, Y., Inada, T.: A functional involvement of ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochimie*, 106: 10-16 (2014). 査読有り
 - Arai, C., Kurahashi, H., Ishiwata, M., Oishi, K., Nakamura, Y.: Clearance of yeast prions by misfolded multi-transmembrane proteins. *Biochimie*, 95: 1223-1232 (2013). 査読有り
doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.009
 - Oishi, K., Kurahashi, H., Pack, C-G., Sako, Y., Nakamura, Y.: A bipolar functionality of Q/N-rich proteins: Lsm4 amyloid causes clearance of yeast prions. *MicrobiologyOpen*, 2:415-430 (2013). 査読有り
doi: 10.1002/mbo3.83
 - Kishida, S., Ping, M., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Abe, T., Sakamoto, K., Onishi, A., Nakamura, Y., Kadomatsu, K.: Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling. *Cancer Res.*, 73(4): 1318-1327 (2013). 査読有り
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3070
 - Ohuchi, S., Shibuya, M., Nakamura, Y.: The RNA aptamer inhibiting human vesicular endothelial growth factor receptor 1 without affecting the cytokine binding. *Biochemistry*, 52: 2274-2279 (2013). 査読有り
doi: 10.1021/bi301669p
 - Fukunaga, J., Nomura, Y., Tanaka, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Sakamoto, T., Kozu, T.: The Runt domain of AML1 (RUNX1) binds a sequence-conserved RNA motif that mimics a DNA element. *RNA*, 19: 927-936 (2013). 査読有り
doi: 10.1261/rna.037879.112
 - Soeno, Y., Fujita, K., Kudo, T., Asagiri, M., Kakuta, S., Taya, Y., Shimazu, Y., Sato, K., Kubo, S., Iwakura, Y., Nakamura, Y., Aoba, T.: Generation of a mouse model with down-regulated U50 snoRNA (SNORD50) expression and its organ-specific phenotypic modulation. *PLoS ONE*, 8: e72105 (2013). 査読有り
doi: 10.1371/journal.pone.0072105
 - Arai, C., Kurahashi, H., Pack, C.-G., Sako, Y., Nakamura, Y.: Clearance of yeast eRF-3 prion [*PSI⁺*] by amyloid enlargement due to the imbalance between chaperone Ssa1 and cochaperone Sgt2. *Translation*, 1(2): e26574 (2013). 査読有り
doi: 10.4161/trla.26574
 - Nomura, Y., Tanaka, Y., Fukunaga, J., Fujiwara, K., Chiba, M., Iibuchi, H., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Kozu, T., Sakamoto, T.: Solution structure of a DNA mimicking motif of an RNA aptamer against transcription factor AML1 Runt domain. *J Biochem.*, 154: 513-519 (2013). 査読有り
doi: 10.1093/jb/mvt082
doi: 10.1016/j.biochi.2014.08.001
 - Nakamura, Y., Ishiguro, A., Miyakawa, S.: RNA plasticity and selectivity applicable to therapeutics and novel biosensor development. *Genes to Cells*, 17: 344-364 (2012). 査読有り
doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01596.x
 - Fujimoto, Y., Nakamura, Y., Ohuchi, S.P.: HEXIM1 binding elements on mRNAs identified through transcriptomic SELEX and computational screening. *Biochimie*, 94: 1900-1909 (2012). 査読有り
doi: 10.1016/j.biochi.2012.05.003
 - Mori, Y., Nakamura, Y., Ohuchi, S.P.: Inhibitory RNA aptamer against SP6 RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 420: 440-443 (2012). 査読有り
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.014
 - Ohuchi, S., Mori, Y., Nakamura, Y.: Evolution of an inhibitory RNA aptamer against T7 RNA polymerase. *FEBS Open Bio*, 2: 203-207 (2012). 査読有り
doi: 10.1016/j.fob.2012.07.004
- [学会発表](計 55 件)
Nakamura, Y. (招待講演): Dual therapeutic action of a neutralizing anti-FGF2 aptamer in bone diseases and bone cancer pain, *Aptamers 2016*, 2016.4.4-5, Oxford (UK)
Takahashi, M., Hashimoto, Y., Sakota, E., Nakamura, Y.: Development of an efficient Cell-SELEX using engineered isogenic cell lines to generate RNA aptamers against a cell surface protein of interest, *Aptamers 2016*, 2016.4.4-5, Oxford (UK)
Amano, R., Takada, K., Tanaka, Y., Nagata, T., Katahira, M., Nakamura, Y.,

Kozu, T., Sakamoto, T.: Binding properties of RNA Aptamer that binds to the transcription factor AML1 Runt domain, *Aptamers* 2016, 2016.4.4-5, Oxford (UK)

野村祐介、福井千恵、戸井田瞳、森下裕貴、新見伸吾、宮川伸、金玲、中村義一、齋島由二: RNAアプタマーを利用した機能性医用材料の開発、第15回日本再生医療学会総会、2016.3.17-19、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

猪股恵美礼、宮川伸、中村義一: RNAアプタマーを用いたFc融合タンパク質の新しい精製法、第38回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

多田健多、天野亮、田中陽一郎、永田崇、片平正人、中村義一、神津知子、坂本泰一: 転写因子AML1 Runt domainを標的とした高親和性RNAアプタマーの特徴、第38回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

野村祐介、福井千恵、戸井田瞳、森下裕貴、新見伸吾、宮川伸、金玲、中村義一、齋島由二: RNAアプタマーを利用した革新的医用材料の開発、第38回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

金玲、中村義一: RNAアプタマーを利用した新規核酸医薬品の開発、第1回日本核酸医薬学会年会、2015.11.30-12.2、京都テレサ(京都府・京都市)

猪股恵美礼、宮川伸、中村義一: RNAアプタマーを用いたFc融合タンパク質の新しい精製法、第1回日本核酸医薬学会年会、2015.11.30-12.2、京都テレサ(京都府・京都市)

天野亮、多田健多、田中陽一郎、永田崇、片平正人、中村義一、神津知子、坂本泰一: AML1(転写因子)タンパク質RuntドメインとRNAアプタマーの相互作用のNMR解析、第1回日本核酸医薬学会年会、2015.11.30-12.2、京都テレサ(京都府・京都市)

野村祐介、福井千恵、戸井田瞳、森下裕貴、新見伸吾、宮川伸、金玲、中村義一、齋島由二: RNAアプタマーを利用した新規医用材料の蛋白質吸着挙動評価、第37回日本バイオマテリアル学会年会、2015.11.9-10、京都テレサ(京都府・京都市)

Takahashi, M., Hashimoto, Y., Sakota, E., Nakamura, Y.: Development of an efficient Cell-SELEX using engineered isogenic cell lines to generate RNA aptamers against a cell surface protein of interest, *The Oligo Meeting*, 2015.10.11-14, Leiden (The Netherlands)

Fukunaga, J., Nomura, Y., Tanaka, Y., Torigoe, H., Nakamura, Y., Sakamoto, T., Kozu, T.: MTG8 TAFH domain binds to RNA G-quadruplex motif that possesses an ability to dissociate the AML1-MTG8 fusion protein/DNA complex, 第74回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Nakamura, Y. (招待講演): Aptamer Therapeutics Targeting Pain and Fibrosis, 18th A-IMBN Conference and SIMS Opening Ceremony, 2015.9.21-22, Cheonan (Korea)

Nakamura, Y. (招待講演): Therapeutic Aptamer Discovery by RiboART System, 第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学(石川県・金沢市)

Hashimoto, Y., Takahashi, M., Sakota, E., Nakamura, Y.: The fate of naturally truncated nonstop mRNA in *Drosophila* cells, 第17回日本RNA学会年会、2015.7.15-17、ホテルライフオー ト札幌(北海道・札幌市)

野村祐介、福井千恵、戸井田瞳、森下裕貴、新見伸吾、宮川伸、金玲、中村義一、齋島由二: RNAアプタマーを利用した革新的医用材料の開発、第17回日本RNA学会年会、2015.7.15-17、ホテルライフオー ト札幌(北海道・札幌市)

Nakamura, Y. (招待講演): Therapeutic Aptamer Discovery by the RiboART System Targeting Lung Fibrosis, 16th Annual TIDES, 2015.5.3-6, Sun Diego (USA)

Nakamura, Y. (招待講演): Aptamer Therapeutics Targeting Pain and Lung Fibrosis, *Aptamers* 2015, 2015.3.31-4.1, Oxford (UK)

Nakamura, Y. (招待講演): Aptamer Therapeutics Targeting Lung Fibrosis, 17th A-IMBN Annual Conference, 2014.12.1-2, Manila (Philippines)

<以下割愛>

〔図書〕(計12件)

藤原将寿、中村義一: アプタマーの創製と医薬開発、「核酸医薬の創製と応用展開」(和田猛監修)、シーエムシー出版、113-121 (2016)

宮川伸、中村義一: RNAアプタマー医薬の最近の動向、*Medical Science Digest*, 40: 360-363 (2014)

山浦順司、中村義一: RNAの造形力と創薬、*化学工業*, 63: 287-294 (2012)

中村義一: アプタマー医薬品、*MEDCHEM NEWS*, 22 (No. 3): 14-19 (2012)

石黒亮、中村義一:RNAアプタマーの分子標的への応用、医薬ジャーナル、48: 85-88 (2012)
松田雄作、中村義一:次世代分子標的薬の研究、核酸医薬、日本臨牀 増刊号「分子標的薬 -がんから他疾患までの治療をめざして-」、70巻、増刊号8、393-397 (2012)
中村義一:特集にあたって、BIO INDUSTRY、Vol.29 No.7 : 3 (2012)
石黒亮、中村義一:アプタマー(核酸抗体)、「新機能抗体開発ハンドブック」(浜窪隆雄 監修)、双文社、不明 (2012)
石黒亮、中村義一:関節炎モデルマウスに対する抗IL-17Aアプタマーの効果、リウマチ科、47巻3号 294-299(2012)
宮川伸、中村義一:アプタマーを用いた抗体精製、「バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発」(山口照英 監修)、シーエムシー出版、239-246 (2012)
石黒亮、中村義一:RNAアプタマーの分子標的への応用、医薬ジャーナル、48: 85-88 (2012)
山浦順司、中村義一:RNA の造形力と創薬、化学工業、63: 287-294 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

名称: IL-17に対するアプタマー及びその使用
発明者: 石黒亮、中村義一、春田和彦、君島智代
権利者: 全薬工業株式会社、東京大学
種類: 特許
番号: PTC/JP2014/57919
出願年月日: 2014年3月20日
国内外の: 国外

名称: ミッドカインに対するアプタマー及びその用途
発明者: 宮川伸、藤原将寿、中村義一、門松健治、牟苺
権利者: 株式会社リボミック、名古屋大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/081451
出願年月日: 2013年11月21日
国内外の: 国外

名称: FGF2に対するアプタマー及びその使用
発明者: 中村義一、石黒亮
権利者: 株式会社リボミック、東京大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2012/ 65029
出願年月日: 2012年6月12日
国内外の: 国外

取得状況(計 2件)

名称: FGF2に対するアプタマー及びその使用
発明者: 中村義一、石黒亮、坂本真衣子
権利者: 株式会社リボミック、東京大学
種類: 特許
番号: U.S. Patent No. 8,772,259
出願年月日: 2010年2月12日
取得年月日: 2014年7月8日
国内外の: 国外

名称: NGFに対するアプタマー及びその使用
発明者: 金玲、中村義一、平松久尚
権利者: 株式会社リボミック、東京大学
種類: 特許
番号: 特許第5027956号
出願年月日: 2010年3月24日
取得年月日: 2012年6月29日
国内外の: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/rnaikagaku/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 義一 (NAKAMURA, Yoshikazu)
東京大学医科学研究所・名誉教授
研究者番号: 4 0 1 1 4 5 9 0

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し