

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0189

研究課題名（和文）内在性遺伝子イントロンへのmiRNA配列挿入による、新規遺伝子治療法開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of novel gene therapy strategy by insertion of artificial miRNA sequence into intronic region of endogenous gene(Fostering Joint International Research)

研究代表者

大塚 正人 (OHTSUKA, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90372945

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 8,200,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、「内在性遺伝子イントロンへ人工miRNA配列を挿入する独自のノックダウン法の、生活習慣病治療への応用」を目指し、1）ハイドロダイナミクス法を用いた肝臓への遺伝子デリバリー技術の確立と最適化、及び2）糖尿病関連遺伝子のノックダウンによる耐糖能の解析を行った。その結果、1）CRISPR試薬はプラスミドよりRNPの状態を導入した方がゲノム編集効率が良いが、肝臓ではHDR修復効率が極めて低いことが示唆された。また、2）独自のノックダウン手法を用いて肝臓での標的遺伝子抑制に成功した。その予備的な解析結果から、作製したノックダウンマウスが新たな耐糖能異常モデル動物となる可能性が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ゲノムDNAの中で通常はあまり使われない領域を人為的に改変することで、疾患に關与する遺伝子の発現をコントロールするという新しい方法論を提案するものである。今回、本手法を用いて糖尿病関連遺伝子の肝臓における発現を抑制できることを示し、この独自のコンセプトの実証に成功した。将来的に、本手法の各種生活習慣病治療への応用を目指していきたい。

また、遺伝子治療を考える上で、成体臓器へ目的の試薬を効率良く核酸を送達する方法の改善は重要な課題であるが、今回、ハイドロダイナミクス法を用いたゲノム編集試薬の肝臓への効率の良い送達条件を見出した。遺伝子治療研究に有用な情報を提供できたと言える。

研究成果の概要（英文）：The CRISPR genome editing system can be a powerful strategy for gene therapy approach. I have been trying to develop a new system to regulate gene expression by CRISPR-assisted insertion of artificial miRNA sequence into an intronic region of an endogenous gene and to apply this method for future gene therapy of lifestyle-related disease. The proof-of-concept study was performed by generating new mouse model in which diabetes-related gene was knocked down in liver cells to improve impaired glucose tolerance. The mouse developed could be a novel animal model for impaired glucose tolerance research. This study also optimized hydrodynamic gene delivery method and showed that hydrodynamic delivery of ribonucleoprotein (RNP) with Cas9 protein mixed with synthetic gRNA elicit better genome editing efficiencies than the plasmid vector-based system in mouse liver.

研究分野：遺伝子工学・発生工学

キーワード：人工miRNA 遺伝子治療 ハイドロダイナミクス法 ゲノム編集 イントロン

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、先天性疾患の新規治療法の一つとして期待されている。究極の遺伝子治療は先天性疾患の原因遺伝子変異そのものを修正することであり、その試みはいくつか報告されているものの、修復効率が非常に低い等の技術的な困難さが問題となっていた。研究を開始した時点では、正常遺伝子発現ベクターを導入して機能欠損している遺伝子の働きを補う補充療法が主であった。しかしこのような補充療法は、発現が一過性であるため定期的に投与しなければならない、ベクターがゲノムの不特定領域に挿入されることによる癌化の可能性等の問題点もあることから、大半の遺伝子治療はまだ探索的なフェーズに留まっていた。

2012年に開発されたゲノム編集技術の一つである CRISPR 系は、標的のゲノム配列を自在に改変可能であり疾患の原因変異の正確な修復も可能であることから、遺伝子治療の強力なツールとして注目されてきていた (Nat Med. 2014, 20:1101-3)。特に、遺伝子が損傷することで発症する遺伝性疾患の原因変異を修復する遺伝子治療への応用が強く期待されており、遺伝性高チロシン血症など、具体的な遺伝性疾患を対象とした成功例も動物レベルで報告された (Science 2014, 345:1184-8, Nat Biotechnol. 2014, 32:551-3)。一方で、多くの人が罹患する生活習慣病(糖尿病や心疾患、肝線維化等)については、ゲノム編集技術をその遺伝子治療法開発に直接結びつけようとする報告はなく、予防や対症療法等に課題が置かれているため、根本的な治療法は未だなかった。

2. 研究の目的

我々は、これまでに確立してきた独自の遺伝子ノックダウン技術を各種研究分野に応用することで、当該技術の実用性と汎用性の向上を目指している。本研究では、内在性遺伝子のイントロン領域に人工 miRNA 配列を挿入 (ノックイン) することで、内在性遺伝子プロモーターから発現させた人工 miRNA により、標的遺伝子の発現を抑制するという、我々が考案した遺伝子ノックダウン法 (Sci Rep. 2015, 5:12799) を、生活習慣病の新規遺伝子治療法開発に応用する。従来の siRNA による遺伝子治療と異なり miRNA がゲノムに安定して挿入されるため、繰り返し投与が不要になる利点を有する。本コンセプトを実証する上で、既にマウスにて

siRNA での耐糖能改善実績のあるインスリン抵抗性関連遺伝子”*Sepp1*”と (Cell Metabolism 2010, 12:483-95)、同様の糖尿病関連へパトカインである”*Lect2*”をモデル系として使用し、インスリン抵抗性の改善を目指す。具体的には、成体肝細胞の *Albumin1* 遺伝子イントロンに”*Sepp1*”もしくは”*Lect2*”を標的とした人工 miRNA 配列を挿入する。それにより、生活習慣病の一つであるインスリン抵抗性の遺伝子治療が可能かを検討する (図1)。これは非コード領域の新しい利用法としても注目に値するものであると言える。この「内在性遺伝子イントロンへ人工 miRNA 配列を挿入する独自のノックダウン法の、生活習慣病治療への応用」の研究を、アメリカ・ジョージア大学の Dexi Liu 博士の研究室との国際共同研究にて実施する。

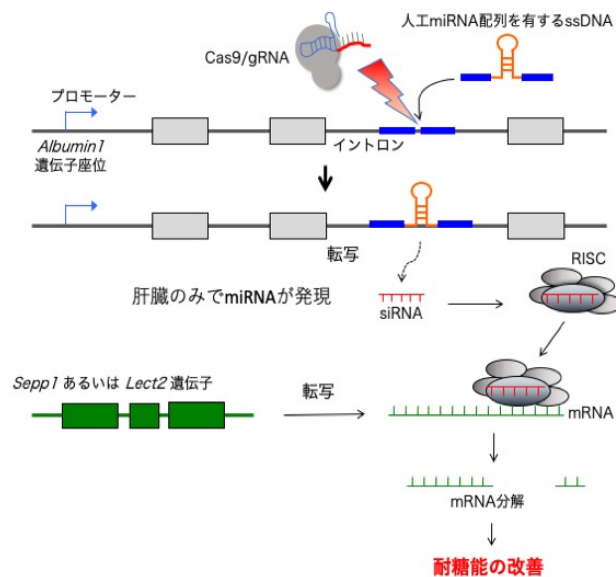


図1：アルブミン遺伝子イントロンへ人工miRNA配列を挿入することによる耐糖能改善戦略

3. 研究の方法

「内在性遺伝子イントロンへ人工 miRNA 配列を挿入する独自のノックダウン法の、生活習慣病治療への応用」を目指し、今回、1) ハイドロダイナミクス法を用いた肝臓への遺伝子デリバリー技術の確立と最適化、及び2) *Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のノックダウンによる耐糖能・インスリン抵抗性の解析、を進めた。研究方法を以下に示す。

(1)ハイドロダイナミクス法を用いた肝臓への遺伝子デリバリー技術の確立と最適化

- ① 野生型マウスを用いたハイドロダイナミクス法の習得

eGFP 発現カセットを有するプラスミド DNA 溶液を生理食塩水で 10 $\mu$ g/ml の濃度に調製し、体重の 10% の容量の液を 5 秒以内で尾静脈から注入した。3~4 日後に処置マウスを屠殺して肝臓を採取し、蛍光実体顕微鏡にて蛍光を観察した。

## ② $\Delta$ eGFP マウスを用いた肝臓ゲノム編集法の確立

我々が独自に開発した eGFP に 1 塩基欠損変異を有している  $\Delta$ eGFP マウス (#197 系統) を用いて実験を行った。ジョージア大学に  $\Delta$ eGFP マウスを導入してコロニーを増やし、遺伝子タイピングを行ってヘテロの個体を実験個体として準備した。10 $\mu$ g/ml の濃度のプラスミド ( $\Delta$ eGFP 遺伝子を標的とした gRNA[Cr1 あるいは Cr6] と Cas9 の発現カセットを有する) と修復用 ssODN (gRNA-Cr6 使用時のみ) を  $\Delta$ eGFP マウス肝臓にヒドロダイナミクス法で導入した。4 日後に処置マウスを屠殺して解剖し、実体顕微鏡下で肝臓における eGFP 蛍光を観察した。これまでの我々の研究から、gRNA-Cr1 では NHEJ による修復を、gRNA-Cr6 では HDR による修復を確認できることが分かっている。

## ③ 肝臓ゲノム編集条件の最適化

Cas9 タンパク質と crRNA/tracrRNA を用いた RNP での導入による肝臓ゲノム編集の可能性についても検討した。Cas9 タンパク質 (5 $\mu$ g/ml) と crRNA/tracrRNA (0.15 $\mu$ M) を含む溶液を調製し、 $\Delta$ eGFP マウスの肝臓にヒドロダイナミクス法で導入した。gRNA-Cr6 使用時は修復用 ssODN も同時に注入した。4 日後に処置マウスを屠殺して解剖し、実体顕微鏡下で肝臓における eGFP 蛍光を観察した。さらに、複数の濃度のプラスミド DNA (Cas9 と gRNA-Cr1 を発現するプラスミド) を用いて同様の実験を行い、注入プラスミド DNA の最適濃度について検討した。

## (2) *Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のノックダウンによる耐糖能・インスリン抵抗性の解析

### ① *Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のノックダウンマウスの開発

肝臓で最も発現量の高い *Albumin1* 遺伝子のイントロン領域に gRNA を設計し、実際に miRNA 挿入マウス系統を作製した。それぞれを系統化してホモマウスを得た。また、*Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のそれぞれについて qPCR 用の primer set を設計し、各ノックダウンマウスのヘテロとホモについて野生型コントロールとともに mRNA 発現量を解析した。また、人工 miRNA 配列が挿入されている *Albumin1* 遺伝子についても、その発現量に影響がないか否かを qPCR で確認した。

### ② 各遺伝子ノックダウンマウスにおける耐糖能・インスリン抵抗性の解析

ノックダウンマウスの耐糖能への影響を検討するため、まずグルコース負荷、インシュリン負荷の実験系を確立した。その後、ホモのノックダウンマウスと野生型マウスを用い、それぞれに 15 週間程度の期間にわたって高脂肪食を与えて耐糖能への影響をグルコース負荷、インシュリン負荷実験により調べた。

## 4. 研究成果

### (1) ヒドロダイナミクス法を用いた肝臓への遺伝子デリバリー技術の確立と最適化

#### ① 野生型マウスを用いたヒドロダイナミクス法の習得

Liu 博士の研究室で技術を習ったが、特に問題なく習得することができた。eGFP 発現カセットを有するプラスミド DNA 溶液の注入実験にて、多くのヒドロダイナミクス法の論文で紹介しているレベルの蛍光を再現性よく得ることに成功した。

#### ② $\Delta$ eGFP マウスを用いた肝臓ゲノム編集法の確立

ゲノム編集用のプラスミド (Cr1 を標的とするもの) を  $\Delta$ eGFP マウスの尾静脈からヒドロダイナミクス法で導入した。4 日後に実体顕微鏡下で肝臓における eGFP 蛍光を観察したところ、注入したすべての個体において緑色蛍光を発していることが明らかとなった。同じ実験を複数回繰り返し、その再現性を確認することができた (図 2)。

また、gRNA-Cr6 を使用し、肝臓における HDR の効率が蛍光で評価できるか否かを検討した。gRNA-Cr6 と Cas9 の発現カセットを有するプラスミドを ssODN とともにヒドロダイナミクス

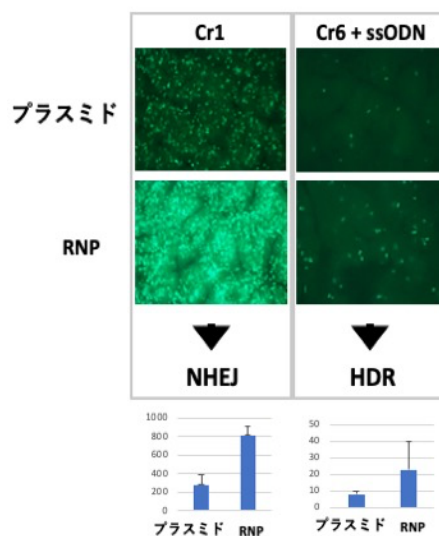


図 2：ヒドロダイナミクス法で注入した CRISPR 試薬による  $\Delta$ eGFP マウス肝臓でのゲノム編集

法で肝臓に導入した結果、肝臓にて蛍光発現が観察されたものの、その蛍光発現細胞の数は gRNA-Cr1 を使用した時 (NHEJ による修復結果) と比較してかなり少なかった (図2)。これは、肝臓では HDR 修復の効率は NHEJ 修復よりはるかに低いことを示唆している。

以上の結果から、 $\Delta$ eGFP マウス系統が、ハイドロダイナミクスを用いた肝臓でのゲノム編集効率の評価に使用可能であることが示唆された。

### ③ 肝臓ゲノム編集条件の最適化

Cas9 タンパク質と crRNA[Cr1]/tracrRNA を用いた RNP での導入による肝細胞 DNA のゲノム編集の可能性についても検討した。RNP を含む溶液を調製し、 $\Delta$ eGFP マウスの尾静脈からハイドロダイナミクス法で導入した。4 日後に実体顕微鏡下で肝臓における eGFP 蛍光を観察したところ、プラスミドを使用した時と比較してより多くの細胞で蛍光発現が観察された (図2)。このことから、少なくとも今回使用した条件では、プラスミドより RNP の方がゲノム編集効率が高いことが示された。

また、Cr6 を標的とした crRNA も使用し、ssODN とともにハイドロダイナミクス法で肝臓に導入することで HDR の効率を評価した。その結果、プラスミドを用いた時と同様に蛍光発現細胞の数は Cr1 を使用した時と比較してかなり少なかったものの、RNP での導入はプラスミドでの導入より高いゲノム編集効率をもたらすことが示唆された (図2)。

さらに、②で用いた Cr1 を標的とするプラスミドを使用し、ゲノム編集用プラスミド DNA の最適注入濃度を検討した結果、②の実験で使用した 1/3 の濃度で最大のゲノム編集効率を得られることが分かった。しかしながら、RNP を用いた際の効率には及ばなかった。

上述したハイドロダイナミクス法を用いた殆どの実験はジョージア大学にて行った。今回の結果から、ハイドロダイナミクス法を利用し、肝細胞ゲノムを標的とした CRISPR ゲノム編集による遺伝子治療法確立を目指す場合、ゲノム編集試薬はプラスミドより RNP の状態が好ましいようである。しかしながら、RNP の方がコスト的負担が大きいいため、プラスミド DNA を用いて条件検討を進め、RNP で本番の実験を行うことが望ましい。また、肝細胞では HDR 効率が大変低く、miRNA を含んだ ssDNA のノックインによる遺伝子治療を行うためには、HDR 効率を大幅に向上させる必要があると考えられる。そのためには、より優れたデリバリー法の選択、HDR 効率向上を目指した各種試薬の併用、などの工夫が必要である。今回使用した独自の  $\Delta$ eGFP マウスは、これらの条件検討を行う上で極めて有用なツールになると期待される。本研究成果は、2019 年アメリカ遺伝子細胞治療学会にて口頭発表に採択された。また、現在本研究結果をまとめた論文を投稿中である。

## (2) *Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のノックダウンによる耐糖能・インスリン抵抗性の解析

### ① *Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のノックダウンマウスの開発

*Sepp1* と *Lect2* の両遺伝子について独自のノックイン手法である *Easi*-CRISPR 法による人工 miRNA のノックインに成功し、それらを系統化して交配することによりホモマウスを得ることができた。qPCR 解析により、両遺伝子ともに mRNA 量の減少が確認されたが、そのノックダウン効率は遺伝子によって異なり、野生型と比較し、*Sepp1* 遺伝子ではホモで 1/10 程度に、*Lect2* 遺伝子ではホモで 3/10 程度であった (図3)。いずれの遺伝子についても、ヘテロマウスはホモマウスの mRNA 発現量の倍程度であった。

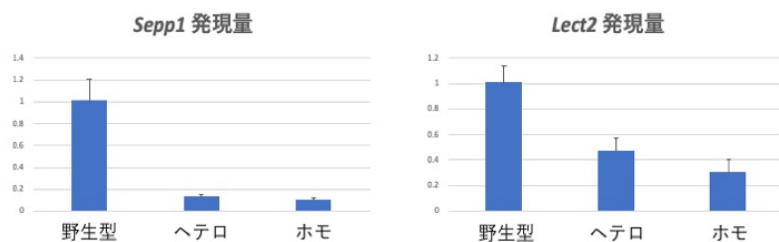


図3：qPCRでの発現量解析

また、人工 miRNA 配列が挿入されている *Albumin1* 遺伝子についても、その発現量に影響がないか否かを qPCR で確認した。*Albumin1* 遺伝子領域の 3 箇所を primer set を設計し、qPCR を行った。その結果、どの primer set を用いた場合でも、*Sepp1* と *Lect2* 遺伝子のいずれのノックダウンマウス (ホモ) についても *Albumin1* 遺伝子の発現が若干減少しているように見えたが、統計的な有意差は得られなかった。

### ② 各遺伝子ノックダウンマウスにおける耐糖能・インスリン抵抗性の解析

高脂肪食を与える前の正常な状態では、グルコース負荷、インシュリン負荷による血糖値への影響は見受けられていないことを確認した。今回、高脂肪食を与えインスリン抵抗性の状態にした際の、各遺伝子ノックダウンの影響を評価することとした。そのために、まず野生型マウスを用い、どの程度の期間高脂肪食を与え続けることで耐糖能への影響が生じるの

かを調べた。その結果、12週間の給餌で高脂肪食の影響が認められた。そこで、12週間の高脂肪食の給餌でノックダウンマウスの解析を行ってみたが、ノックダウンマウスと野生型マウス（ともに高脂肪食を与えたもの）間での差は僅かであった。そこで、15週間程度まで与え続けてから解析を行うこととした。

ホモのノックダウンマウスと野生型マウスを用い、それぞれに15週間程度の期間にわたって高脂肪食を与えて耐糖能への影響を調べた。現時点では一部の予備的な結果を得ている段階であるが、既報のノックアウトマウスの報告とは逆に、*Sepp1* ノックダウンマウスにおいて耐糖能が低下しているようであった（図4）。今後、より詳細な解析が必要である。*Lect2* 遺伝子のノックダウンマウスに関しては、耐糖能の影響は確認できなかった。



図4： *Sepp1* ノックダウンマウスを用いたグルコース負荷試験

これらのノックダウンマウスを用いた実験は東海大学で行なった（インシュリン抵抗性関連の遺伝子治療法開発を進めているジョージア大学のLiu博士に、一部意見を伺って進めた）。今回得られた結果は、内在性遺伝子イントロンへ人工miRNA配列を挿入する独自のノックダウン法が、組織特異的遺伝子（*Albumin1* 遺伝子）のイントロンにも応用可能であることを初めて示したものであり、本手法が肝臓での遺伝子発現抑制を介した遺伝子治療に十分応用可能であることを示唆している。しかしながら、*Sepp1* ノックダウンマウスの解析からは、耐糖能に対する影響はむしろ悪化するという予備的な結果が得られたことから、ノックダウンによる遺伝子治療の標的として *Sepp1* は適さない可能性がある。今後、肝臓における *Sepp1* 発現の役割を再評価するとともに、糖尿病の病態形成に関与する新規分子機序の解明も目指し、新たなノックダウン標的遺伝子の探索も行いたい。今回作出した *Sepp1* ノックダウンマウスは、新たな耐糖能異常解析モデル動物となる可能性も高く、国内外の研究者が利用できるよう、論文発表後にはリソースセンターへ寄託したい。

## 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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakurai Takayuki, Kamiyoshi Akiko, Ohtsuka Masato, Gurumurthy Channabasavaiah B., Sato Masahiro, Shindo Takayuki	4. 巻 1874
2. 論文標題 Isolation and Analysis of a Genome-Edited Single-Hepatocyte from a Cas9 Transgenic Mouse Line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 257 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8831-0_15	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 Nakamura Shingo, Ishihara Masayuki, Watanabe Satoshi, Ando Naoko, Ohtsuka Masato, Sato Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Intravenous Delivery of piggyBac Transposons as a Useful Tool for Liver-Specific Gene-Switching	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3452 ~ 3452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19113452	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 -
1. 著者名 Kamimura Kenya, Yokoo Takeshi, Abe Hiroyuki, Sakai Norihiro, Nagoya Takuro, Kobayashi Yuji, Ohtsuka Masato, Miura Hiromi, Sakamaki Akira, Kamimura Hiroteru, Miyamura Norio, Nishina Hiroshi, Terai Shuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of Diphtheria Toxin-Based Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 472 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020472	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 -
1. 著者名 Miura Hiromi, Quadros Rolan M, Gurumurthy Channabasavaiah B, Ohtsuka Masato	4. 巻 13
2. 論文標題 Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 195 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nprot.2017.153	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 該当する

1. 著者名 Quadros Rolan M., Miura Hiromi, Harms Donald W., Mansour Suzanne L., Ohtsuka Masato, Gurumurthy Channabasavaiah B. et al	4. 巻 18
2. 論文標題 Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-017-1220-4	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 H Miura, CB Gurumurthy, M Ohtsuka
2. 発表標題 Development of a reporter mouse model suitable for evaluation of in vivo genome editing efficiency
3. 学会等名 2018 Cold Spring Harbor meeting: Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 浩美、佐藤 正宏、水谷 晃子、大塚 正人
2. 発表標題 ゲノム編集効率評価系モデルマウスの開発と評価
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromi Miura, Yutaka Inagaki, Channabasavaiah B Gurumurthy, Masahiro Sato, Masato Ohtsuka
2. 発表標題 Development of a mouse model suitable for in vivo genome editing efficiency studies
3. 学会等名 14th Transgenic Technology Meeting (TT2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦 浩美、稲垣 豊、佐藤 正宏、大塚 正人
2. 発表標題 In vivoゲノム編集効率評価系モデルマウスの開発
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大塚正人
2. 発表標題 in vivoゲノム編集効率評価系モデルマウスの作製と検証
3. 学会等名 第4回日本遺伝子細胞治療学会 若手研究会セミナー2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Ohtsuka
2. 発表標題 Development of a Reporter Mouse Model For In Vivo Evaluation of Genome Editing
3. 学会等名 the American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Miura, Masahiro Sato, Channabasavaiah B Gurumurthy, Masato Ohtsuka
2. 発表標題 Creating knockdown mouse models using CRISPR-Cas system
3. 学会等名 The 15th TRANSGENIC TECHNOLOGY MEETING (TT2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://masato2.wixsite.com/ohtsuka-lab>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	リウ デキシ  (LIU Dexi)	ジョージア大学・College of Pharmacy・Panoz Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	マ ヨンジー  (MA Yongjie)	ジョージア大学・College of Pharmacy・Senior Research Associate	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	チャン グイシェン  (ZHANG Guisheng)	ジョージア大学・College of Pharmacy・Research Professional II	
その他の研究協力者	上村 顕也  (KAMIMURA Kenya)  (00579146)	新潟大学・大学院医歯学総合研究科・講師  (13101)	
その他の研究協力者	中村 伸吾  (NAKAMURA Shingo)  (00505323)	防衛医科大学校・講師	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
その他の 研究協 力者	三浦 浩美  (MIURA Hiromi)  (90599523)	東海大学・医学部・研究員	