

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290023

研究課題名(和文) TDP43の分子内病原配列に対する特異抗体を用いた新規分子標的治療・診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel molecular targeting therapy and probe, using antibodies against pathogenic epitopes in TDP-43

研究代表者

漆谷 真 (Makoto, Urushitani)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60332326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に筋萎縮性側索硬化症の原因蛋白質であるTDP-43の2つのRNA認識部位(RRM1とRRM2)内の配列を抗原とし、異所性局在型や凝集体形成型のTDP-43のみを認識する抗体を作出した。本研究ではこれらの抗体を用いて、TDP-43凝集体の形成を阻止する低分子化合物の同定や一本鎖抗体(scFv)を複製し細胞内のTDP-43凝集体の除去効果を検証した。RRM1抗体を用いた競合ELISA法によってTDP-43の異常会合界面に結合し凝集体形成を阻止する化合物を同定した。RRM2を抗原とし蛋白質分解シグナルを持つscFvはTDP-43凝集体と特異的に結合し分解促進し細胞死を抑える成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Using our original antibodies against TDP-43, a pathogenic protein for amyotrophic lateral sclerosis, we tested their utility as a tool for high throughput drug screening, and as a specific scavenger of pathogenic TDP-43 aggregates in cells.

For high throughput screening, a polyclonal antibody against dimer interface residues in RRM1 domain, was used in the competitive ELISA, in which molecules which prevents antibody binding with TDP-43 were screening as a hit molecules. Screening worked and several hits were picked up, which interacted dimer interface and efficiently prevents aggregate formation in the transfected culture cells.

To eliminate intracellular TDP-43 aggregates, several types of single chain fragment of variant (scFv) containing proteolysis signals, were generated. These scFv were transfected with normal or aggregate-prone TDP-43. It was shown that our scFv was a promising tool to eliminate misfolded and pathogenic TDP-43 in ALS.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症(ALS) ミスフォールド蛋白質 神経変性疾患 抗体医療 蛋白質分解

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は体制運動ニューロン系の系統変性により、全身の随意筋群の進行性萎縮と筋力低下を主徴とする神経変性疾患であり、発症後は3-5年で呼吸筋麻痺にいたる致死性疾患である。1869年にJean-Martin Charcotが2名のALS症例を記載して以降、孤発性ALSの原因は長らく不明であった、2006年にTAR DNA-binding protein-43kDa(TDP-43)は孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態関連蛋白質として同定された。細胞質への異所性局在、核内外におけるRNAとの反応、リン酸化や封入体形成など多くの形態・機能異常が明らかにされてきたが、分子基盤であるTDP-43生理的構造からの逸脱機構については不明であった。

我々は高圧力NMR解析と質量解析によってRRM1配列の脆弱配列を同定しその異常会合がTDP-43ミスフォールディングを惹起すること、会合面に存在するシステイン残基の修飾がTDP-43プロテオパチーの多くの特徴を再現することを初めて明らかにした(Shodai, JBC 2013)。さらに、これまでにTDP-43の機能ドメインであるRRM1,2を高圧力NMRによる構造解析や既報の結晶解析の結果から得られる作業仮説に基づき、構造と機能維持に重要な分子内配列の同定に成功した(Shodai, Plos ONE 2012; Shodai JBC 2013)。つまりRRM1においては第4-5βシート部位が異常会合することによりTDP-43のALS病理と機能異常を再現すること、RRM2においては核外脱出シグナル(NES)内の酸性アミノ酸(Glu246、Asp247)が細胞内封入体や異所性局在等の病的状態で分子表面に露出し、微小環境の変化によって機能喪失型オリゴマーが形成されるという知見である。これはRRM1の異常会合を阻止することがTDP-43プロテオパチーの進展を抑制し、さらにRRM2の表面露出配列は細胞内の分子標的の対象となると同時に、TDP-43の異所性局在や異常構造体の診断プローブの開発に有用である可能性を示唆するものである。

我々はRRM1、RRM2とも当該部位を認識する抗体の作製に成功しており、特に後者は正常TDP-43とは反応しないモノクローナル抗体を作出した。

こうした凝集体モデル、病原構造特異認識抗体は、凝集体合成阻止を目指した治療法開発、TDP-43の異常構造を早期に捉え、来る先制に重要な早期診断薬開発の素地となるものである。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は上記の抗体を用いて、TDP-43蛋白質のRRMドメインで我々が同定したいくつかの分子内配列に結合する低分子のTDP-43プロテオパチーの治療、診断薬の開発に有用か否かを明らかにし、さらに

ミスフォールドTDP-43を特異的に認識するモノクローナル抗体3B12Aの小型細胞内抗体(intrabody, nanobody)の開発、治療効果の検討を既存のシステムで検証し、さらに我々の提唱するTDP-43プロテオパチーモデルを用いて新規のモデル動物の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 競合ELISA法を用いた病原構造エピトープに結合する低分子化合物スクリーニング RRM1は5つのβシート構造を有し、4番目(84)と5番目(85)が逆並行性βシートを形成する。さらに我々はRRM1がC173とC175の分子内ジスルフィド結合によってコンフォメーションが維持されていることを見出し、この分子内ジスルフィド結合の破綻は容易にRRM1分子間のβ会合による異常な二量体を形成する(Shodai, JBC 2012)。その異常会合界面(図のcore c)の結合物質は異常な二量体形成を抑制する可能性がある。

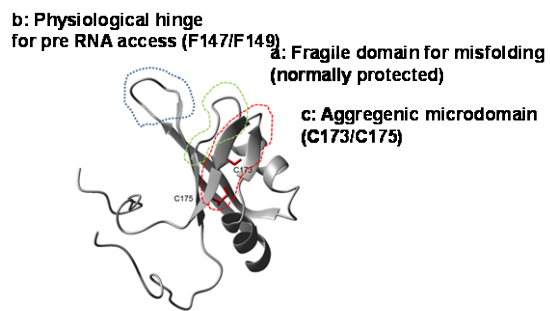


図1. RRM1ドメインの分子内病原配列(Shodai, JBC 2013)

我々は大腸菌由来の組換えRRM1蛋白質をコートしたELISAプレートに対し、core cに対する抗体を反応させる際に、薬1000種類の化合物を有する市販の低分子ライブラリー(Sigma LOPAC)由来の化合物を同時に加え、抗体反応を阻害するものを探索した。次に同定された化合物を、全長TDP-43のRRM1ドメインのシステイン残基をセリン残基に置換させた易凝集形成型TDP-43を遺伝子導入したHEK293A細胞の培養培地に加え、凝集体形成が抑制されるか否かを検討した。さらに凝集体を形成した化合物をin silico解析によってRRM1分子との結合部位を探索した。

2) 3B12A自己分解型一本鎖抗体(single chain variable fragment; scFv)作製とTDP-43凝集体分解効果の検証

3B12A抗体の抗原と結合する可変領域(Fv)配列をクローニングし、低分子の一本鎖抗体(single chain of Fv; scFv)の発現配列を得て、これを哺乳細胞発現ベクターに組み込みこむことで、ミスフォールド型TDP-43に対する細胞内抗体(intrabody)を作成した。

細胞質型、凝集体型 TDP-43 との特異的結合を確認したのち、scFv にさらにシャペロン介在性オートファジーシグナル(CMA)を付与したもので、細胞質凝集体型 TDP-43 (NLS 変異 C173S/C175S) を発現するプラスミドを培養細胞内に共発現させ凝集体減少と細胞死抑制効果を *in vitro* で確認した。さらに妊娠 15 日齢のマウス胎仔を含む子宮を母体の吸入麻酔下に取り出し、脳室内に電気穿孔法を用いて TDP-43 (野生型、凝集体形成型)、3B12A CMA-scFv あるいはベクタコントロール、さらに遺伝子導入コントロールとして mCherry を導入し 3 日後に胎仔を取り出し、脳切片の免疫染色を行った。一部のマウスは生後 21 日まで生育させ、脳の初期発生に対する影響の有無を調べた。



図 2 3B12A scFv の重鎖 (VH) と軽鎖 (VL) の遺伝子、アミノ酸配列 (a) ドメインマップ (b).

3) 神経特異的に TDP-43 細胞質凝集体を形成する遺伝子改変マウスの作出

孤発性 ALS のモデルマウスの作出を目的とし、多くの遺伝子改変マウスが報告されてきたが、臨床所見と神経病理所見を忠実に再現するマウスは存在しない。我々は既に発見した TDP-43 の RRM1 ドメインのシステインの置換によって ALS 様凝集体を形成するコンストラクト (C173S/C175S TDP-43) を用いて、神経細胞に孤発性 ALS モデルマウスの作製を試みた。

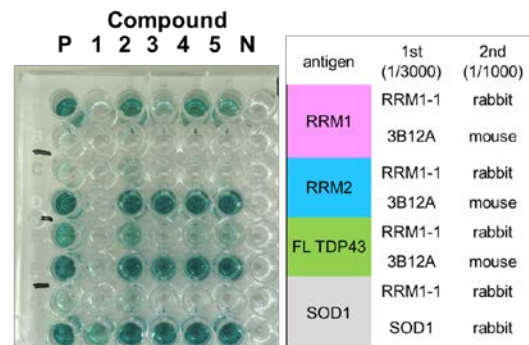
ヒト Synapsin1 プロモーター下に C173S/C175S TDP-43 の cDNA を連結したプラスミドを作出。遺伝子導入実験によって神経系の不死化細胞や、マウス初代培養神経細胞で発現することを確認し、C57/B6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。PCR による Genotyping 陽性の産仔を解析し、mRNA と蛋白質発現、ロタロッド、体重、握力を評価し、脳脊髄切片の免疫組織解析を行った。

4. 研究成果

1) 競合 ELISA 法を用いた病原構造エピトープに結合する低分子化合物スクリーニング

競合 ELISA 試験において RRM1 の二量体会合界面配列への抗体結合を阻害する化合物として初回スクリーニングで 13 種類、全長

TDP-43 と反応し、RRM2, SOD1 蛋白質とは反応せず、1 次抗体として抗 RRM2 抗体や SOD1 抗体の反応を阻害しない化合物を選抜するための 2 次スクリーニングで 5 種類 (Calmidazolium chloride, Tamoxifen, JNJ-40418677, Gossypol, Sanguinarine chloride) に絞り込んだ。興味深いことにこれらはいずれも、Huntington 病などの神経変性疾患やアミロイド β 蛋白質の凝集阻害薬と



Compound
1 Calmidazolium chloride, 2. Tamoxifen, 3. JNJ-40418677, 4. Gossypol, 5. Sanguinarine chlorid

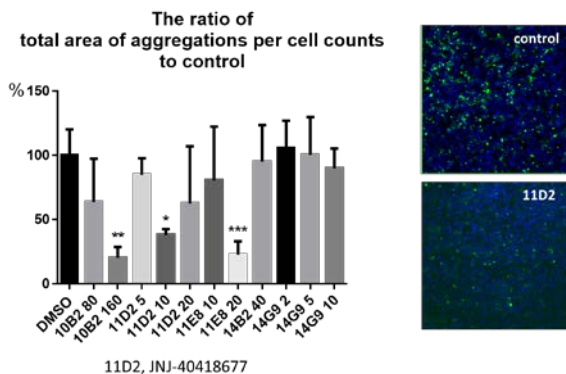


図 3 (上段) RRM1-1 抗体を用いた競合 ELISA 所見。RRM1 と FL-TDP43 をコートしたプレートにおける RRM1-1 抗体の反応阻害 (透明) をした分子がヒット化合物。(下段) ヒット化合物を用いた、TDP-43 凝集体形成を阻害効果。

して報告されているものが含まれていた。特に JNJ-40418677 は、培養細胞の MTT アッセイでは、凝集体形成阻害効果を認めた濃度 (5 μ M) で明らかな毒性を認めなかった。さらに徳島大学先端酵素学研究所 加藤裕介先生と共同研究による *in silico* 解析による Docking データでは core c をカバーする pose が得られた。

[JNJ-40418677]
core-c と接する pose が得られた。そのうち、もっとも強い affinity の pose は -7.8kcal/mol であった。

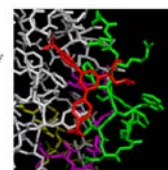


図 4 *in silico* Docking 解析。ヒット化合物のうち JNJ-40418677 は RRM1 の異常会合界面と結合する。

一方 3B12A 抗体を用いた競合 ELISA 試験では ヒット化合物は得られなかった。

2) 3B12A 自己分解型一本鎖抗体 (single chain variable fragment; scFv) 作製と TDP-43 凝集体分解効果の検証

様々な

TDP-43-FLAG(野生型、各移行シグナル変異型(mNLS)、核内凝集体形成型、細胞質凝集体形成型)と3B12A scFv-MycをHEK293A細胞に共発現させ、固定後に免疫二重蛍光染色を行ったところ、HEK293Aに発現した intrabody はミスフォールド型 TDP-43 の封入体と共局在しており、さらに免疫沈降法により intrabody が野生型 TDP-43 ではなくミスフォールド型 TDP-43 と結合することが示された。さらに Myc 抗体の結合性を評価するサンドイッチ ELISA 法にて評価したところ、免疫二重染色、免疫沈降同様に mNLS, 凝集体型のみ強い反応性を示した。これらの結果から、細胞内環境において intrabody がミスフォールド型 TDP-43 に対して結合能を有することが示唆された。

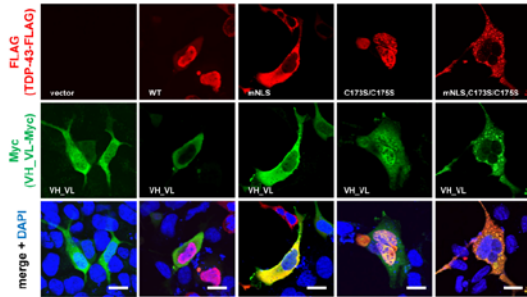


図 5 #3B12A scFv の抗原特異的結合性。(上段)免疫蛍光法。TDP-43-FLAG と 3B12A scFv-Myc を HEK293A 細胞に遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体 (赤)、抗 Myc 抗体 (緑) で二重染色を行った。(下段)抗 Myc 抗体を用いた免疫沈降法による特異的結合の確認。

次にミスフォールド型 TDP-43 に対する intrabody の分解・除去効果を検証した。まず intrabody が全長抗体同様、ミスフォールド型 TDP-43 に対する特異的結合性を生細胞内でも保持しているかを確認した。

HEK293A に発現させた TDP-43 に対する特異的な蛍光リガンドを用いて chase assay を行った結果、intrabody は野生型 TDP-43 の分解には影響を与えず、ミスフォールド型 TDP-43 を分解し、発現を有意に減少させた。さらに time lapse imaging で intrabody による TDP-43 の封入体の変化を観察した結果、ミスフォールド型 TDP-43 による細胞質封入体の個数やサイズが intrabody によって経時的に抑制され、さらに細胞死も有意に抑制された。これらの結果から、intrabody がミスフォールド型 TDP-43 を分解・除去する作用を有することが示された。

さらに neuro2a に発現させた TDP-43 による cytotoxicity assay および cell viability

assay を行ったところ、ミスフォールド型 TDP-43 によって誘導された細胞毒性や細胞死が、intrabody によっていずれも有意に抑制される結果が得られた。このことから、神経系培養細胞において intrabody がミスフォールド型 TDP-43 による細胞毒性を緩和し、その結果、細胞生存率を上昇させることが立証された

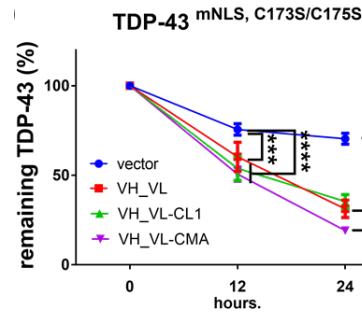
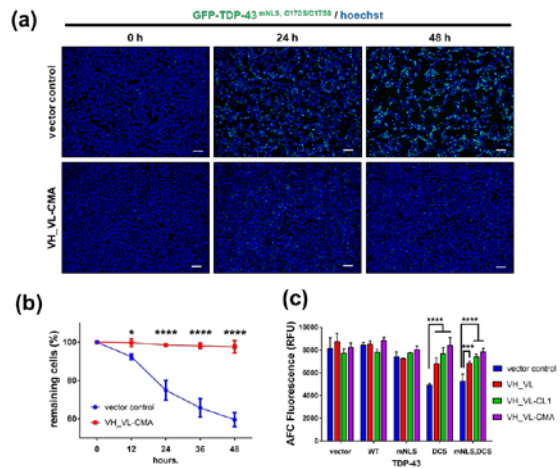


図 6 Halo タグを用いた Pulse-chase アッセイ。TDP-43-Halo と 3B12A scFv を HEK293 細胞に遺伝子導入後、30 分間蛍光リガンドを培養培地内に投与。0, 12, 24 時間後に細胞ライセートを回収



し細胞内に残存する TDP-43 を定量した。

図 7 time-lapse 顕微鏡を用いた 3B12A scFv の TDP-43 凝集体減少効果と細胞毒性の検証。

2) 子宮内電気穿孔法によって胎仔脳に TDP-43 の細胞質封入体が形成され、それらはリン酸化と K48 にてユビキチン化されていることを確認した。さらに CMA-scFv の共発現によって、凝集体のみ著明に減少し、野生型 TDP-43 は全く影響を受けなかった。CMA-scFv の初期発生、出生後の脳に持続発現させた影響を検討したところ、生後 21 日目のマウスは正常に離乳、発育し、行動学的に異常を認めなかった。灌流固定後、神経マーカー、ミクログリアマーカー、アストロサイトマーカーである NeuN, Iba1, GFAP による免疫染色で scFv による神経細胞死や明らかなグリオシスは確認されなかった。

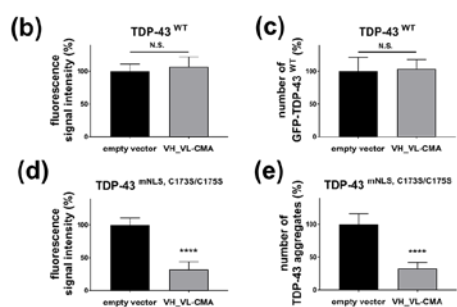


図8 妊娠13日目のマウスを麻酔、子宮内胎児脳室に凝集型あるいは野生型TDP-43-EGFPと3B12A scFv遺伝子、内部標準としてmCherry遺伝子を生体内電気穿孔法を用いて導入し、16日後に胎児脳を固定、抗GFP抗体、抗Myc抗体を用いて染色。蛍光強度を定量化した。

3) 神経特異的にTDP-43細胞質凝集体を形成する遺伝子改変マウスの作出

細胞質にTDP-43の異常封入体を形成する遺伝子を発現する新たなALSモデルマウスを作出しP0世代を得、表現系の解析を行ったが、目的蛋白質が運動ニューロンで十分に発現しておらず表現型も得られなかった。この理由としてニューロンでの恒常的な凝集体発現の毒性が強く胎生致死となったためと考えている。

考察

1) RRM1と同ドメインの二量体会合界面を認識する抗体反応との反応を阻害する物質をヒット化合物とする、我々の競合ELISA戦略は効率の良いスクリーニングであり、実際ヒット化合物はアルツハイマー病やハンチントン病の治療薬候補として報告されたものが多かった。RRM2蛋白に対する結合阻害化合物は同定し得なかったが、3B12A抗体の結合阻害物質は脳内TDP-43凝集体診断に有用なプローブとなる可能性もあり、RRM1、RRM2ともに今後さらに多くのライブラリーをスクリーニングし、候補物質の探索を進める。

2) scFvにCMAを付与させた自己分解型細胞内抗体が、凝集体との結合によってHsp70を誘導して、凝集体をリフォールドさせ、さらに分解効率を上げることが示唆された。さらに子宮内電気穿孔法による胎児脳での凝集体除去効果はin vivoにおいてもこのscFvが有効であることを示している。今回ニューロン特異的に細胞質凝集体を発現する遺伝子改変マウスの作製を試みたが、症状、病理ともALSを再現するマウスは得られなかった。今後はテトラサイクリンによって発現制御が可能はダブルトランスジェニックマウスの作製を進め、今回同定された低分子やアデノ関連ウイルスベクターによる細胞内抗体の作製と効果についての検証を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10件)

- 1) Tamaki Y, Urushitani M, 他. Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals. *Sci Rep*, 2018, 8, 6030
- 2) Hikiami R, Urushitani M, 他. Amyotrophic Lateral Sclerosis after Receiving the Human Papilloma Virus Vaccine: A Case Report of a 15-year-old Girl. *Int Med* 2018, doi: 10.2169/internalmedicine.0285-17.
- 3) Kaji S, Urushitani M, 他. Pathological endogenous α -Synuclein accumulation in oligodendrocyte precursor cells potentially induces inclusions in multiple system atrophy. *Stem Cell Rep* 2018 Feb 13;10(2):356-365.
- 4) Ayaki T, Urushitani M, 他. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017, doi: 10.1093/jnen/nlx109
- 5) Hikiami R, Urushitani M, 他. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A with an autosomal recessive inheritance; the first report of an adult-onset disease. *J Hum Genet* 2017, doi: 10.1038/s10038-017-0353-3.
- 6) Carandang A, Urushitani M, 他. Velocity of intraneural blood flow is increased in inflammatory neuropathies: sonographic observation. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2017, 8(5):455-457.
- 7) Kobatake Y, Urushitani M, 他. Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *J Neurol Sci* 2017 Jan 15;372:369-378. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.10.034>
- 8) Kawamoto Y, Urushitani M, 他. Activated caspase-9 immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 2016, 628:207-212.
- 9) 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症病態におけるTDP-43. *神経治療学* 2017, 34, 72-78
- 10) 漆谷 真. VHL (von Hippel-Lindau protein). 「脳内環境辞典」高橋良輔、山中宏二、樋口真人、漆谷 真 編. メディカルドゥ社, 2017, 114-145

[学会発表] (計 20件)

- 1) 漆谷 真. 分解型細胞内抗体を用いたALSの分子標的治療. シンポジウム6. 運動ニューロン疾患: 治療の展望, 第35回日本神経治療学会総会 2017年11月 大宮
- 2) 漆谷 真. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における細胞内抗体を用いた異常TDP-43除去の試み. 第29回日本神経免疫学会学術集会. シンポジウム2 神経変性疾患治療における免疫学的アプローチ. 2017年10月. 札幌
- 3) 漆谷 真. 病原蛋白質特異的エピトープに対するALSの分子標的治療開発戦略. 日本薬学会, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017. 2017年8月. 京都
- 4) 漆谷 真. VHL/CUL2によるミスフォール

ド型 TDP-43 の分解障害とオリゴデンドロサイト封入体形成。ホットトピック。第 57 回日本神経学会学術大会。2016 年 5 月。神戸

5) Kitamura A, Urushitani M, 他. Cilostazol reduced gliovascular damage and working memory impairment via endothelial protection in a mouse model of vascular dementia. World Congress of Neurology. 2017, September, Kyoto.

6) Ayaki T, Urushitani M, 他. Myositis and muscular inclusions in Nakajo-Nishimura syndrome. World Congress of Neurology. 2017, September, Kyoto.

7) Tamaki Y, Urushitani M, 他. Degradative intrabody for selective elimination of pathogenic TDP-43 aggregates in vitro and in murine embryos' cerebrum. World Congress of Neurology. 2017, September, Kyoto.

8) Yamaguchi Y, Urushitani M, 他. Pathological analysis of a novel conformational specific anti-SOD1 antibody using human and mice tissues in amyotrophic lateral sclerosis. World Congress of Neurology. 2017, September, Kyoto.

9) Kobashi S, Urushitani M, 他. Development of an effective technology for inductive differentiation from bone marrow-derived mononuclear cells to neuroprotective microglia. World Congress of Neurology. 2017, September, Kyoto.

10) Tamaki Y, Urushitani M, 他. The development of therapeutic intrabody against misfolded TDP-43 for ALS. Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2016, November, San Diego.

11) Okada Y, Urushitani M, 他. Paradoxical effects of TLR4 stimulation to B cells in multiple sclerosis. ECRIMS 2016. September, London

12) 北川尚之、漆谷 真他. 上位運動ニューロン徴候を主徴とし、急速に進行した TDP-43 変異筋萎縮性側索硬化症の剖検例。第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会。2016 年 6 月 3 日、弘前

13) 岡田信久、漆谷真他. 再発性多発軟骨炎に伴う脳炎 2 症例の検討。第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年 5 月、神戸

14) 河本恭裕、漆谷 真他. Activation of caspase-9 in the neuronal and glial elements in dementia with Lewy bodies. 第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年 5 月、神戸

15) 星野友則、漆谷 真他. The mechanism of Motor Neuron Degeneration in Ubiquitin Proteasome System Dysfunction. 第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年 5 月、神戸

16) 玉木良高、漆谷 真他. The development of therapeutic intrabody against misfolded/unfolded TDP-43 for ALS. 第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年 5 月、神戸

17) 端祐一郎、漆谷 真他. 自己免疫性てんかんにおける末梢血リンパ球の表面抗原解析。第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年

5 月、神戸

18) 三橋賢大、漆谷 真他. 脊髄サルコイドーシスの治療に関する臨床的検討。第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年 5 月、神戸

19) 岡田洋一郎、漆谷 真他. 多発性硬化症患者 B 細胞による炎症性サイトカインと抑制性サイトカインの産生パターン。第 57 回日本神経学会 学術集会。2016 年 5 月、神戸

20) 菱澤美貴、漆谷真他. Measurement of TDP-43 in peripheral blood cells of ALS. 第 57 回日本神経学会学術集会。2016 年 5 月、神戸

〔図書〕(計 1 件)

脳内環境辞典。高橋良輔、山中宏二、樋口真人、漆谷 真 編。メディカルドゥ社、2017 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：異常 TDP-43 を分解除去する抗体断片

発明者：漆谷真、玉木良高

権利者：滋賀医科大学

種類：特許

番号：特願 2018-049752

出願年月日：平成 29 年 10 月 10 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患の発症リスクを予測する方法、診断薬及び治療薬

発明者：漆谷真、藤原範子、伊東秀文

権利者：滋賀医科大学、兵庫医科大学、京都大学

種類：特許、番号：特許第 5699286

取得年月日：平成 27 年 2 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕

1) 滋賀医大神経内科ホームページ

<http://shiga-neurology.com/>

(研究紹介)

<http://shiga-neurology.com/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

漆谷 真 (うるしたに まこと)

滋賀医科大学内科学講座神経内科 教授

研究者番号：60332326

(2) 研究分担者

守村 敏史 (もりむら としふみ)

滋賀医科大学神経難病研究センター助教

研究者番号：20333338

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし