

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12532

研究課題名(和文)ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子の構築と細胞内微小環境の核酸科学

研究課題名(英文)Development of a nanoparticle to release nucleic acids in a mitochondrial environment

研究代表者

山田 勇磨 (YAMADA, Yuma)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：60451431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア(Mt)の機能不全(Mtのゲノム異常)は、Mt脳筋症、神経変性疾患、心筋梗塞、糖尿病などの様々な疾患と関連しており、Mtを標的とする核酸医薬(アンチセンスオリゴ核酸)が革新的治療法として注目されている。本研究では、Mt環境応答性核酸ナノ粒子搭載ドラッグデリバリーシステム(DDS)を構築し、細胞Mt内部における核酸放出過程および遺伝子発現制御およびMt・細胞機能を評価した。本研究は、核酸科学研究分野に多彩な機能を有するMtという新しい細胞内微小環境を創出し、Mtを標的としたナノメディシン創製に貢献する事が期待される。

研究成果の概要(英文)：It was recently reported that mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) form the basis of mitochondria (Mt) related diseases. Therefore, the delivery of nucleic acids targeting mutant mtDNA would be expected to be an innovative therapeutic strategy for such diseases. To date, we developed a MITO-Porter, a nano carrier for mitochondrial delivery. The aim of this study is to develop a nanoparticle that can release nucleic acids in response to the Mt environment following its delivery to the Mt. In this study, we evaluated nanoparticles with various Mt environment responsive peptides, and we succeeded in constructing a nanoparticle that was capable of releasing nucleic acids in response to conditions that mimic the Mt environment. In addition, we confirmed successful regulation of the mitochondrial gene expression by transfection of nanoparticles using the MITO-Porter. Our findings can contribute to development nanomedicine for mitochondrial gene therapy.

研究分野：薬物送達学

キーワード：薬物送達システム ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは多彩な機能を有した細胞内小器官であり、その機能異常によって様々な疾患を誘発する。近年、ミトコンドリアの機能不全はミトコンドリア独自のゲノム (mtDNA) の変異・欠損が関連している事が報告されており、**ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療**が種々の疾患の革新的治療法として注目されている。これらの疾患治療を実現するためには、ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) が必要だが、有用な DDS は開発されておらず核酸においては皆無であった。

ミトコンドリアを標的とした核酸医薬治療を成功させるためには、ミトコンドリア治療に十分量の核酸をミトコンドリアまで送達し機能させる必要がある。封入率の上昇が期待できる核酸ナノ粒子化パッケージは有用な戦略になり得るが、核酸が機能するためにはナノ粒子からの核酸放出が必須である。研究代表者はミトコンドリア膜との膜融合を介して内封物質を送達する、ミトコンドリア融合性リポソーム (MITO-Porter) を開発し、[Y. Yamada et al, *Biochim Biophys Acta* 1778, 423-32 (2008)], 核酸ナノ粒子をミトコンドリア内部に導入する事に成功していた [E. Kawamura, Y. Yamada et al, *Mitochondrion* 13, 610-4 (2013)]。代表者は、MITO-Porter システムに**ミトコンドリア環境応答性核酸放出制御能**を付加する事で、今までは実現不可能であった**ミトコンドリア遺伝子制御**を中心とするライフサイエンス研究・ミトコンドリア遺伝子治療を実現させられると考え、本申請研究を提案した。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリアのゲノム異常は、ミトコンドリア脳筋症、神経変性疾患、心筋梗塞、糖尿病などの様々な疾患と関連しており、ミトコンドリアを標的とする核酸医薬 (オリゴ核酸 (DNA・RNA)) が革新的治療法として注目されている。本研究では、ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 DDS を構築し、細胞ミトコンドリア内部における核酸放出過程および遺伝子発現制御の評価を研究目的とした。本研究は、核酸科学研究分野に多彩な機能を有するミトコンドリアという新しい細胞内微小環境を創出し、ミトコンドリアを標的としたナノメディシン創製に貢献する事が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、「**ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 DDS の構築**」のために、H27年度に (1) ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子の構築、(2) ミトコンドリア環境下における核酸放出評価、(3) ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載

MITO-Porter の構築、「**生細胞ミトコンドリアへの核酸ナノ粒子の送達および遺伝子抑制検証**」のために、H28年度に (4) 核酸ナノ粒子の細胞内動態の最適化、(5) 生細胞を用いたミトコンドリア遺伝子抑制の検証を下記に示す方法で実施した。

#### (1) ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子の構築

これまでに MITO-Porter による核酸ナノ粒子のミトコンドリアマトリクス送達は成功しているが、ミトコンドリア環境応答性核酸放出制御能に関する検討は行っていなかった。本研究では、ミトコンドリアが細胞内部で特殊環境領域 (アルカリ性領域、特異的酵素反応など) を有している事に着目し、核酸ナノ粒子を形成するカチオンポリマーに環境応答性を付加したポリマーを設計した。具体的には、**アルカリ性環境下で正電荷が消失するヒスチジン**を基本骨格とするポリマーを合成しオリゴ核酸のナノ粒子化を検討した。酸性・中性環境で正電荷を有するヒスチジンは負電荷のオリゴ核酸と静電的相互作用を介してナノ粒子を形成するが、アルカリ性領域下 (ミトコンドリア環境) でヒスチジンの正電荷が消失するため、ミトコンドリア内でのナノ粒子が崩壊、オリゴ核酸放出が期待できると期待した。

表1 核酸ナノ粒子調製用ポリマー

	アミノ酸配列 (N → C)
<sup>1</sup> STR-R8	RRRRRRRR
<sup>1</sup> STR-H8	HHHHHHHH
<sup>1</sup> STR-H4R4	HHHHRRRR
<sup>1</sup> STR-H2R2H2R2	HHRRHHRR
<sup>1</sup> STR-H2R4H2	HHRRRRHH
<sup>1</sup> STR-R2H4R2	RRHHHHRR
Protamine	PRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRRGRRRRR

<sup>1</sup>STR: ステアリル基がペプチド配列のN末に修飾

これまでの検討で、オリゴ核酸のナノ粒子化に実績のあるアルカリ性領域で正に帯電するアルギニン (R, pKa = 12.5) を基盤としたステアリル化 (STR)-R8、ヒスチジン (H, pKa = 6.0) を基盤とした STR-H8、R と H の複合型ペプチド (STR-H4R4 群)、プラスミド DNA 凝縮素子として報告されている Protamine をポリマーとして用いた。

核酸ナノ粒子はオリゴ RNA 核酸と表 1 に示すポリマーを異なる比率で混合しナノ粒子を形成させ、粒子径と表面電位を測定し粒子形成の確認をした (図 1)。

#### (2) ミトコンドリア環境下における核酸放出評価

**核酸放出評価法の確立:** 環境変動に伴った核酸ナノ粒子からの核酸放出特性を評価するため、環境 (pH) 変動に依存せず核酸ナ

ノ粒子からの核酸放出を測定可能な評価法の確立を試みた。はじめに、溶液中に遊離するオリゴ RNA の定量方法として、Ribogreen による定量と Cy5 標識オリゴ RNA を用いた定量の2種類の測定法を比較した (図2)。次に、クエンチングを原理とした核酸放出率の評価系を最適化し、核酸放出評価に用いた。

**pH 環境の変動に伴う核酸ナノ粒子からの核酸放出の評価:** ミトコンドリア環境の一つとしてアルカリ性環境が挙げられる。pH が核酸ナノ粒子からの核酸放出に及ぼす影響を評価した。pH4.0 の条件で調製した核酸ナノ粒子を様々な pH の緩衝液 (pH 4、5、6、7、8) に添加し、核酸放出率を算出した (図3)。

**アニオン分子の添加による核酸ナノ粒子からの核酸放出の評価:** ミトコンドリアマトリクスに送達された核酸ナノ粒子は、マトリクスに存在する負電荷を有する mtDNA やタンパク質などの生体分子と相互作用して核酸を放出する可能性が考えられる。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) をアニオン分子のモデルとして用い、pH8.0 の条件で調製した核酸ナノ粒子を、異なる濃度の DSS 溶液に添加し、核酸放出率を算出した (図4)。

### (3) ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 MITO-Porter の構築:

ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子を MITO-Porter に搭載し、粒子径・表面電位を測定した。ポリマーとして、STR-H4R4 群、Protamine、ポリエチレンイミン (PEI) を用いた。PEI はこれまでにミトコンドリアへのオリゴ RNA 核酸送達素子として実績があるのでコントロールとして用いた [R. Furukawa, Y. Yamada et al, *Biomaterials* 57, 107-115 (2015)]。核酸ナノ粒子の MITO-Porter へのパッケージングは、単純水和法、reverse-phase evaporation vesicle (REV) 法、エタノール希釈法を用いて検討した。

### (4) 核酸ナノ粒子の細胞内導体の最適化:

蛍光標識を施した核酸ナノ粒子を搭載した MITO-Porter を調製し、核酸ナノ粒子の細胞取り込み能をフローサイトメトリーを用いて評価した。また、ミトコンドリアを蛍光染色後に、核酸ナノ粒子の細胞内局在を共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡を用いて観察した。

### (5) 生細胞を用いたミトコンドリア遺伝子抑制の検証:

ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質である COX2 コードするミトコンドリア内因性 mRNA を標的とするアンチセンスオリゴ RNA (ASO) のナノ粒子をミトコンドリア内部に導入し、その遺伝子発現抑制を検証した。具体的には、ASO ナノ粒子を MITO-Porter を用いてミトコンドリア内部に導入し、定量的 RT-PCR による mRNA の定量、ウエスタンブロット法を用いた標的タンパク質の発現量を評価した。また、ミトコンドリア内の膜電位を検出可能な蛍光色素 JC-1 を利用して評価

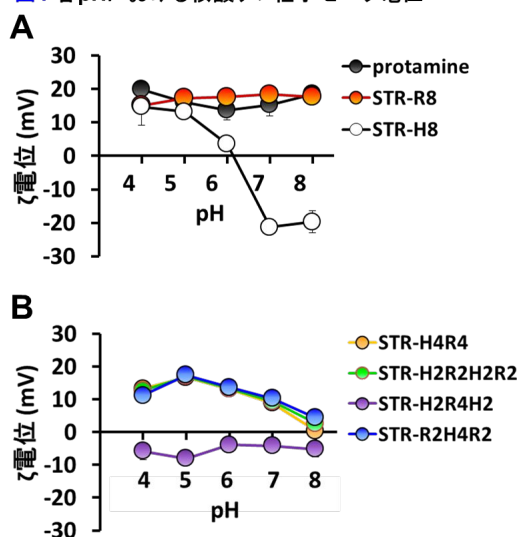
し、ミトコンドリア呼吸鎖機能を維持する COX2 ノックダウン時の膜電位の低下を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子の構築

種々の検討の結果、オリゴ RNA 核酸とポリマーを、**pH 4.0 の緩衝液中で、適切な比率 (Nitrogen(N)/Phosphate (P) 比=5.0)** で混合する事でナノ粒子を形成させる事が可能となった (粒子径 100 nm 程度)。調製した核酸ナノ粒子を様々な pH の緩衝液 (pH 4、5、6、7、8) に添加しインキュベーションした後、電位を測定した (図1)。

図1 各pHにおける核酸ナノ粒子ゼータ電位



電位測定の結果、STR-H8 核酸ナノ粒子は、電位については pH 4、5 で正の値、pH 7、8 では負の値を示した。この結果より、**STR-H8 核酸ナノ粒子は正電荷を消失する pH 応答性を有する**事が示された。一方、STR-R8 および Protamine を用いて調製した核酸ナノ粒子では、電位は pH に依らず 15-20 mV の正の値を示した (図 1A)。

次に、R と H を組み合わせた複合型のペプチド STR-H4R4 群 (STR-H4R4、STR-H2R2H2R2、STR-H2R4H2、STR-R2H4R2) を用いて核酸ナノ粒子を調製し、そのゼータ電位と pH の関係性を評価した。**ペプチドの C 末端が RR** である STR-H4R4 と STR-H2R2H2R2、STR-R2H4R2 を用いて調製した核酸ナノ粒子については、**pH が高くなると粒子表面の正電荷が減弱したものの、負には変化しなかった**。一方、**C 末端が HH** である STR-H2R4H2 は他の STR-H4R4 群とは異なり、**酸性条件下でも負電荷のナノ粒子を形成**する事が示された (図 1B)。

### (2) ミトコンドリア環境下における核酸放出評価 核酸放出評価法の確立:

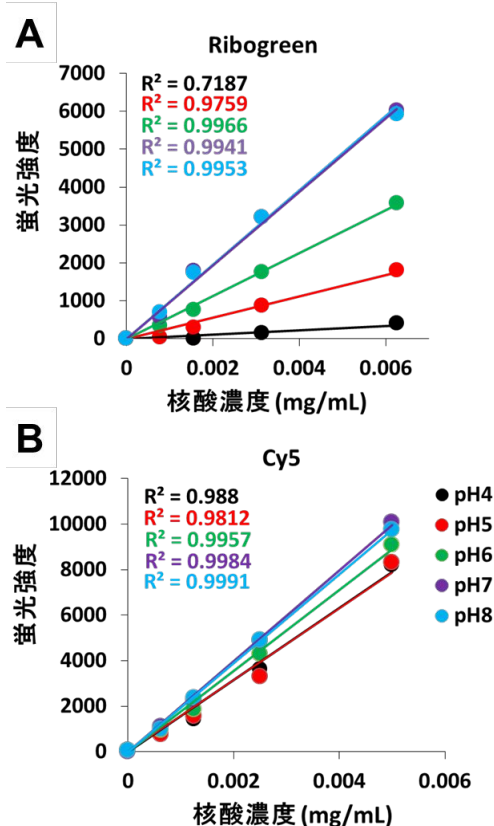
溶液中に遊離する RNA を Ribogreen および Cy5 標識 RNA を用いて測定した。その結果、Ribogreen による遊離核酸の定量は酸性条件下において、

線形性は保持されるものの蛍光強度が著しく減弱した(図 2A)。一方、Cy5 の蛍光強度は酸性条件下で多少の減弱は生じたが、測定にあたっては十分な蛍光強度が保持された(図 2B)。これらの結果より、核酸の定量には Cy5 の蛍光強度を測定する事にした。

次に、クエンチングを原理とした核酸放出率の評価系の構築を試みた。Cy5 標識 RNA をナノ粒子化した場合、ナノ粒子構造内部では複数の Cy5 分子が極めて密に存在するため、励起光の照射によって Cy5 から放出された蛍光は分子間でクエンチングして消光する。一方、ナノ粒子構造が崩壊している場合には、Cy5 が溶液中に遊離し分子間距離が増大しているためクエンチングが生じず、Cy5 から放出された蛍光を検出できる。種々の検討の結果、下記の式を用いて**核酸放出率 (%)**を算出する事が可能となった。

**核酸放出率 (%)**  
 = 各条件における核酸ナノ粒子の蛍光強度 / 核酸単独の蛍光強度 × 100

図2 核酸定量の検討

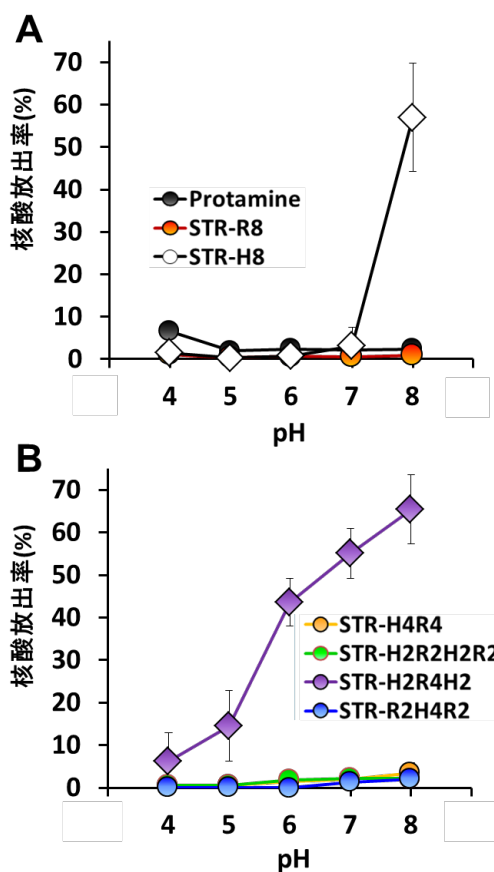


**pH 環境の変動に伴う核酸ナノ粒子からの核酸放出の評価:** R を基盤とするプロタミンおよび STR-R8、H を基盤とした H8、STR-H8、さらに R と H を組み合わせた STR-H4R4 群を用いて、核酸ナノ粒子を調製し、異なる pH の緩衝液中での核酸放出率を測定した(図 3)。その結果、STR-H8 ( )は pH 8 で核酸を放出し、核酸ナノ粒子構造が崩壊する事が示唆された(図 3A)。その他の R を基盤とするポリマーからなる核酸ナノ粒子についてはいずれも pH の変動による核酸放出を示さな

った(図 3A)。

また、STR-H4R4 群 (H および R を 4 つずつ含有)では STR-H2R4H2 ( )核酸ナノ粒子が、pH の変動に伴った核酸放出を示したが、その他の R/H 複合ポリマーからなる核酸ナノ粒子では、核酸放出は確認されなかった(図 3B)。以上の結果より、ポリマーの構成アミノ酸の数だけではなくペプチド配列中の順序も放出効率に影響する事が示唆された。STR-H8 および STR-H2R4H2 は両端にヒスチジン基を有するポリマーであり、このアミノ酸の配列順序が pH 変動による影響を受けやすい事が示唆された。

図3 pH変動に伴う核酸放出の推移

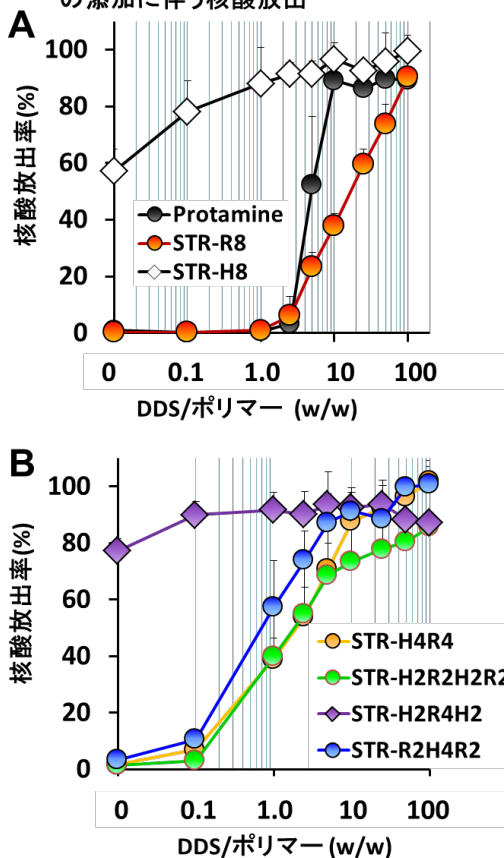


**アニオン分子の添加による核酸ナノ粒子からの核酸放出の評価:** 核酸ナノ粒子溶液を異なる濃度の DSS 溶液に添加し、核酸放出を評価した。ただし、マトリクス環境(アルカリ性領域)を模倣するため DSS 溶液の pH は 8.0 とした。評価の結果、塩基性条件で粒子が自壊する STR-H8 ( )および STR-H2R4H2 ( )からなる核酸ナノ粒子は質量比 1 相当以下の DSS の添加によって 90%以上の核酸を放出した(図 4)。また、アルカリ性環境で粒子が自壊しない STR-H4R4 群(STR-H4R4、STR-H2R2H2R2、STR-R2H4R2)からなる核酸ナノ粒子に関しても、R を基盤とする STR-R8 およびプロタミンを用いて調製した核酸ナノ粒子と比較して pH 8 環境下では約 10 倍高い核酸放出能を有する事が示された(図 4)。

~ の結果より、STR-H4R4 群の STR-H4R4、

STR-H2R2 H2R2、STR-R2H4R2 を用いる事で、酸性～中性領域の核酸ナノ粒子を可能とし、さらにマトリクス環境（アルカリ性、アニオン性分子存在下）での核酸放出能は、従来用いていた R を基盤とするポリマー、プロタミンおよび STR-R8 よりも優れていた。

**図4** デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の添加に伴う核酸放出



**(3) ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 MITO-Porter の構築：**

ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子（STR-H4R4 群）を MITO-Porter に搭載し、粒子径・表面電位を測定したところ、単純水和法による調製が最適である事が明らかとなった。一方で、STR-H4R4 群の核酸ナノ粒子を搭載した MITO-Porter のオリゴ RNA 核酸封入率（10%以下）は、プロタミン・PEI（80%以上）と比較して低かったため、遺伝子抑制評価を実施する事が困難であった。そのため、(4)および(5)の検討は、PEI 核酸ナノ粒子を用いて検討を進めた。

**(4) 核酸ナノ粒子の細胞内導体の最適化：**

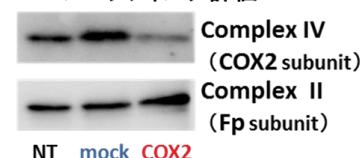
フローサイトメトリーを利用した評価の結果、核酸ナノ粒子が細胞に効率良く取り込まれている事を確認できた。また、蛍光顕微鏡を用いて細胞内局在を確認したところ、核酸ナノ粒子がミトコンドリアと共局在している様子が観察された。

**(5) 生細胞を用いたミトコンドリア遺伝子抑制の検証：**

COX2 コードするミトコンドリア

ア内因性 mRNA を標的とする ASO を搭載した MITO-Porter を構築し、ASO 送達時の遺伝子発現制御の検証実験を行った。ヒト子宮頸癌由来細胞 HeLa 細胞にトランスフェクションし標的 mRNA の発現量を定量的 RT-PCR した結果、ASO 導入により 40%の抑制効果が認められた。さらに、標的タンパク質 COX2 の発現量の低下も観察された（図5）。また、ノックダウン時に膜電位が低下する事も確認した。

**図5** COX2タンパク質のウェスタンブロッティング評価



本申請研究では、ミトコンドリア遺伝子制御システムを構築するために、『ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 DDS の構築』および『生細胞ミトコンドリアへの核酸ナノ粒子の送達および遺伝子抑制検証』に関する研究を遂行し以下の成果を得た。

A. ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 DDS を構築した。

B. 生細胞ミトコンドリアを標的とした内因性 RNA ノックダウンに成功した。

**【国内外における位置づけとインパクト】**

本研究は、核酸科学研究分野に多彩な機能を有するミトコンドリアという新しい細胞内微小環境を創出し、ミトコンドリアを標的としたナノメディシン創製に貢献する事が期待される。本申請研究で得た成果を元に、異常ミトコンドリアを認識する遺伝子治療用ナノカプセルの構築 **[基礎研究 B]**に関する申請研究が採択され、現在鋭意遂行中である。本申請研究で確立した基盤技術は申請者にとってこれからの根幹をなす重要な成果であると確信している。

**【今後の展望】**

本申請研究では、ミトコンドリア環境応答性核酸ナノ粒子搭載 DDS の構築およびミトコンドリア遺伝子発現の抑制を実現した。しかしながら、ミトコンドリア環境応答性ナノ粒子のパッケージングの最適化は研究期間中に検討する事ができなかったため、後継研究で詳細に検討を進めていきたい。

**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）

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Y. Yamada. Mitochondrial DDS Opens Innovative Pharmaceuticals. Yakugaku Zasshi 136: 55-62 (2016) (査読有) doi: 10.1248/yakushi.15-00227-3.
2. 山田勇磨. ミトコンドリア DDS が拓く医療・ライフサイエンス革命. Drug Delivery System 30: 348-362 (2015) (査読無) doi: org/10.2745/dds.30.348.

3. R. Furukawa, Y. Yamada, E. Kawamura, H. Harashima. Mitochondrial delivery of antisense RNA by MITO-Porter results in mitochondrial RNA knockdown, and has a functional impact on mitochondria. *Biomaterials* 57: 107-115 (2015) (査読有) doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.022.
4. Y. Yamada, Y. Fukuda, H. Harashima. An analysis of membrane fusion between mitochondrial double membranes and MITO-Porter, mitochondrial fusogenic vesicles. *Mitochondrion* 24: 50-55 (2015) (査読有) doi: 10.1016/j.mito.2015.07.003.
5. Y. Yasuzaki, Y. Yamada, T. Ishikawa, H. Harashima. Validation of mitochondria gene delivery in liver and skeletal muscle via hydrodynamic injection using an artificial mitochondrial reporter DNA vector. *Molecular Pharmaceutics* 12: 4311-4320 (2015). (査読有) doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00511.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 山田勇磨、原島秀吉. ミトコンドリア標的型ナノカプセル・MITO-Porter を用いたミトコンドリアを標的とする疾患治療戦略の提案. 第10回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2016年11月6日. 群馬大学昭和キャンパス(群馬県前橋市).
2. 山田勇磨. ミトコンドリア DDS の創製と心疾患治療への展開. 第3回 iHF フォーラム. 2016年8月7日. ホテルオークラ東京(東京都港区).
3. Y. Yamada, H. Harashima. MITO-Porter, mitochondrial drug delivery system toward innovative therapy. DRUG DELIVERY 2015, World Drug Delivery Summit. 2015年8月18日 ヒューストン(アメリカ).
4. 山田勇磨、原島秀吉. ミトコンドリア標的型ナノマシン“MITO-Porter”の開発. 第24回日本Cell Death学会シンポジウム1. 2015年7月11日. 大阪大学会館(大阪府豊中市).
5. 山田 勇磨. ミトコンドリア DDS が拓く医療・ライフサイエンス革命. 第31回日本DDS学会 第7回奨励賞受賞講演. 2015年7月3日. 京王プラザホテル(東京都新宿区).

〔図書〕(計 2 件)

1. Y. Yamada, H. Harashima. Springer. *Handb. Exp. Pharmacol.: Pharmacology of Mitochondria* (in press)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 心不全の治療及び/又は予防に用いるための心筋幹細胞

発明者: 原島秀吉, 山田勇磨, 阿部二郎, 武田充人

権利者: 国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-223069

出願年月日: 2016年11月16日

国内外の別: 国内

〔その他〕

**報道関連情報:**

ミトコンドリア DDS (平成 28 年度北海道科学技術奨励賞(知事表彰)) [[http://www.pref.hokkaido.lg.jp/kz/kg/H28kagisy\\_top.htm](http://www.pref.hokkaido.lg.jp/kz/kg/H28kagisy_top.htm)] に関する研究成果が北海道新聞(2017年1月7日・28面)に掲載された。

**アウトリーチ活動情報:**

市民講演での発表

ミトコンドリア核酸医薬に関する研究成果を**ミトコンドリア病を知る市民公開講座(2016年11月19日(札幌))**で紹介した。本講座に参加されていた異分野の基礎研究者、臨床研究者・医学者と治療法に関する具体的な議論ができた。本講座を通じて、自分の研究を患者の皆さんに伝える事ができ、また患者さんと直接議論する事で、患者視点のニーズを知る事ができた。長中期的な研究計画を改めて設計して、基礎研究の確立・医療への貢献をしてきたいと強く思う良い経験ができた。

7 SEAS PROJECT への参加

「ミトコンドリア病」の新しい治療法の研究開発を目指す創薬プロジェクト『7 SEAS PROJECT』 [<https://7sp.life/>] の構成メンバーとなり、本研究成果を医薬品へと発展させ、医療・経済・社会への貢献を目指し、新たな研究を計画・推進中である。

**ホームページ:**

北海道大学大学院薬学研究院 HP :

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp>

北海道大学大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室(所属研究室) HP :

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 勇磨 (YAMADA, Yuma)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号: 60451431

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

兵頭 守 (HYODO, Mamoru)

愛知工業大学・工学部・講師

研究者番号: 30548186

(4) 研究協力者

なし