

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659584

研究課題名(和文) 高分子型ミセルを用いた脳腫瘍標的テーラーメイドドラッグデリバリーの開発

研究課題名(英文) Ligand-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anti-Cancer Drug into Malignant Tumor

研究代表者

三浦 裕 (Miura, Yutaka)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40557980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管の内皮細胞や脳腫瘍で過剰発現が認められるインテグリンに対して特異的に結合する環状RGD(cRGD)をリガンド分子として搭載した薬剤内包ミセルを開発した。得られたcRGD導入ミセルは、U87MG細胞の皮下移植ならびに同所移植モデルに対して優れた抗がん活性を示すことが確認された。cRGD導入ミセルのがん集積メカニズムをin vivo共焦点顕微鏡を利用して評価した結果、cRGD導入ミセルは速やかにがん組織へと移行することが観察された。このようなりガンド分子の導入による速やかながん組織への移行は、トランスサイトosisによる能動的な薬剤デリバリーの結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The installation of ligand molecules such as peptides onto nanocarriers is now considered an important strategy to improve the selectivity of drug delivery. Among these ligands, Arg-Gly-Asp (RGD) peptides are promising ligand molecules for targeting alpha v beta 3 integrins, which are overexpressed in angiogenic sites and tumors, such as human glioblastoma (U87MG). In this study, the cyclic RGD was introduced to the maleimide-surface functionalized dichloro(1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded micelles by Michael addition reaction. Intravital confocal laser scanning microscopy revealed that the cRGD-linked polymeric micelles (cRGD/m) accumulated rapidly and had high permeability from vessels into the tumor parenchyma. It was confirmed that the selective and accelerated accumulation of cRGD/m into tumors occurred via an active internalization pathway, possibly transcytosis, thereby producing significant anti-tumor effects in an orthotopic mouse model of U87MG human glioblastoma.

研究分野：臨床医工学

キーワード：ドラッグデリバリー ナノ材料 脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Doxil®に代表されるドラッグデリバリー (DDS) 製剤は、がんに対する標的治療薬として臨床での有効性が示されている。これらは腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系に起因する Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果に基づいてがん組織への集積効果を利用しているが、DDS の集積性は、がんの種類や部位によって異なっており、脳腫瘍などの一部のがんでは著しく低下している (PNAS 95: 4607 (1998))。特に脳腫瘍においては星細胞腫、膠芽腫、髄芽腫、乏突起膠腫、上衣腫はじめ発生母地に準じた多様な腫瘍タイプが存在し、組織学的、解剖学的見地からみて、これらの血管形態が大きく異なっていることが明らかになっている。したがって、脳腫瘍を標的とし、血流を介した全身投与型の DDS を実現するためには、これまでの EPR 効果に基づく DDS を超えるデリバリー戦略が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、リガンド搭載高分子型ミセルを用いた脳腫瘍を標的としたテーラーメイド・ドラッグデリバリーシステム(T-DDS)の創成を目的とした。これにより、従来型の DDS に比べて飛躍的に高いがん選択性、集積性を達成する一方で、難治がんである脳腫瘍に対する有効な治療法を確立する。具体的には脳腫瘍や脳腫瘍周辺の新生血管に過剰発現する $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンを特異的に認識するペプチド分子“環状 RGD (cRGD)”をリガンドとしてドラッグ内包ミセル表面へ導入し、それらリガンドの数や密度を制御することによって、脳腫瘍の種類、新生血管の血流量ならびに表面マーカー、延いては腫瘍の進行度、グレードに応じて適時選択可能なデリバリー戦略の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 能動的に脳腫瘍を標的する白金制がん剤内包高分子ミセルの開発

脳腫瘍へナノ DDS 医薬が到達するためには、ナノ DDS 医薬が血流から Blood Tumor Barrier (BTB) を通過し、がん組織の細胞外マトリックスを浸透する必要がある。そこで我々はオキサリプラチン活性体である DACHPt を内包する高分子型ミセルの表面へマレイミド基を導入し、そこへリガンド分子としてカベオレ介在経路によって内在化することが見出されている環状 RGD ペプチドを結合させたリガンド搭載高分子型ミセルを開発した。

ミセルを構成する共重合体の合成は N_3 -PEG-NH₂ をマクロ開始剤とした *N*-carboxy anhydride of γ -benzyl L-glutamate の重合と、続く末端基の変換、脱保護、マレイミド基の導入の 4 ステップを経て最終目的物である末端マレイミド poly(ethylene glycol)-*b*-poly(glutamic acid)

を得た (図 1)。

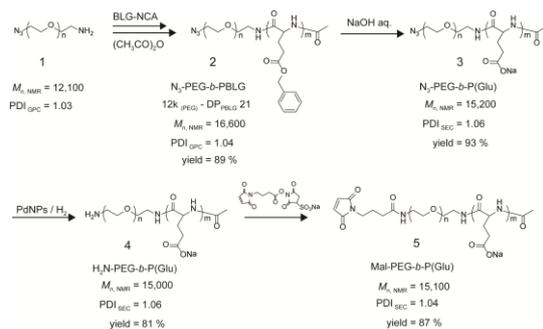


図 1. 末端にマレイミド基を有する PEG-*b*-Poly(glutamic acid) の合成

次に DACHPt と得られた末端マレイミド poly(ethylene glycol)-*b*-poly(glutamic acid) と末端未修飾の poly(ethylene glycol)-*b*-poly(glutamic acid) を任意の割合で混ぜ合わせることによって、マレイミド導入率の異なる前駆体ミセルを形成させた。最後にチオール残基を有する環状 RGD をマイケル付加反応を用いてミセル表面へ結合させ、0-40%の異なる割合で環状 RGD を導入した DACHPt 内包ミセルを調整した (図 2)。また、コントロールリガンドである環状 RAD を導入した DACHPt 内包ミセルも同手法を用いて調整した。得られたミセルの物性は ¹H NMR、動的光散乱、ICP-MS にて評価した。

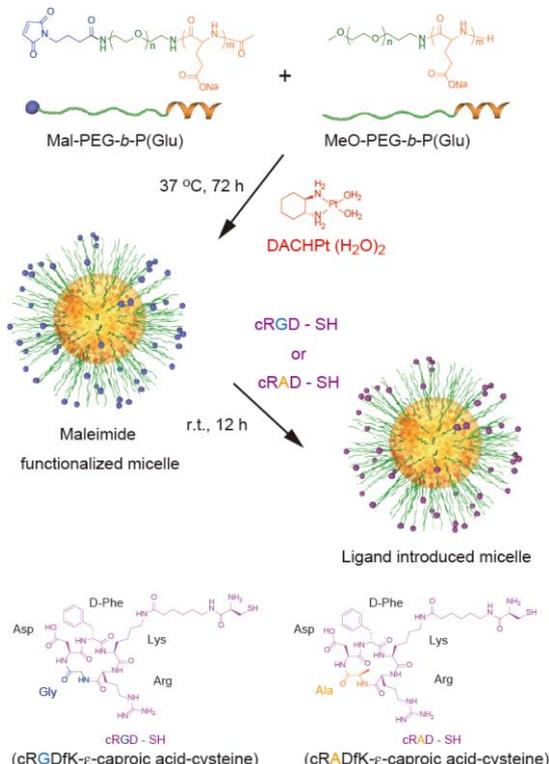


図 2. 表面に環状 RGD リガンドを導入した白金制がん剤内包ミセルの合成

(2) 環状 RGD を導入した高分子ミセルの脳腫瘍細胞に対する取込量と細胞毒性の評

価

上記(1)で調整したリガンド導入率の異なる各ミセルをヒトグリオーマ細胞株(U87MG)に対して播種し、1-24時間後の細胞取込量をICP-MSと共焦点レーザー顕微鏡によって評価し、リガンド導入の有用性と最適ナリガンド導入率を検討した。また、細胞毒性の評価に関しても、U87MGならびにインテグリンをサイレンシングしたU87MGの二つのグリオーマ細胞株を用いて、環状RGDの優位性について評価を行った。

(3) 抗腫瘍効果の確認

U87MG細胞を皮下へ移植した実験モデルマウスと、同じくU87MGをマウスの脳へ移植した同所移植モデルを準備し、各ミセルの腫瘍増殖抑制効果について評価した。また、*in vivo*共焦点レーザー顕微鏡と蛍光ラベル化したミセルを用いて、ミセルの血流から腫瘍への移行性について観察した。

4. 研究成果

(1) 能動的に脳腫瘍を標的する白金制がん剤内包高分子ミセルの開発

表 1. 表層にリガンドを導入した白金制がん剤内包ミセル

Micelles	cRGD (%)	cRAD (%)	Size (nm)	PDI (h)	Zeta potential (mV)
ctrl/m	0	0	27	0.096	-3.1±0.5
5% cRGD	5±2	0	28	0.088	-3.4±0.3
10% cRGD	10±2	0	30	0.100	-2.8±0.7
20% cRGD	22±2	0	29	0.099	-2.3±0.4
40% cRGD	43±2	0	31	0.093	-2.9±0.3
20% cRAD	0	20±2	31	0.101	-2.5±0.7

得られたリガンド導入ミセルの物性を表1に示す。リガンドの導入率は¹H NMRによって算出され、環状RGD、環状RADともに80%以上の転化率にてミセルへ結合していることが確認された。光散乱測定の結果から、得られたミセルは全て単分散の球状ミセルであり、30nmの粒径を有していることが確認された。また、ゼータ電位測定の値より、全てのミセルがほぼ中性の電荷を帯びていることが確認できた。

(2) 環状RGDを導入した高分子ミセルの脳腫瘍細胞に対する取込量と細胞毒性の評価

U87細胞へ各ミセルを播種した後、1-24時間後に細胞を回収し、濃硝酸で処理した。

その後、ICP-MSにて分析した結果、環状RGDの導入率が20%以上のミセルに於いて短時間での細胞取込が確認された(図3右)。これらの傾向は共焦点顕微鏡でも確認された(図3左)。環状RADではこのような特性を示さなかったことより、これらの傾向は環状RGDによって誘起されたことが明らかとなった。

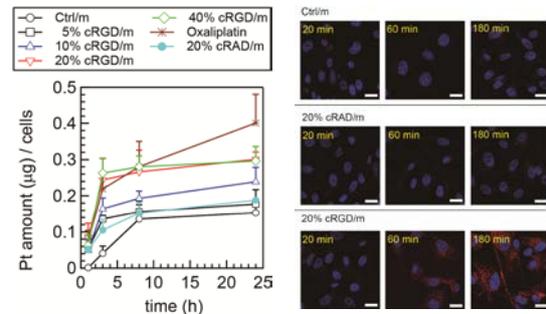


図 3. U87MG細胞に対する各ミセルの取込。ICP-MSによる評価(左図)、共焦点顕微鏡による評価(右図。青:細胞核、赤:ミセル)。

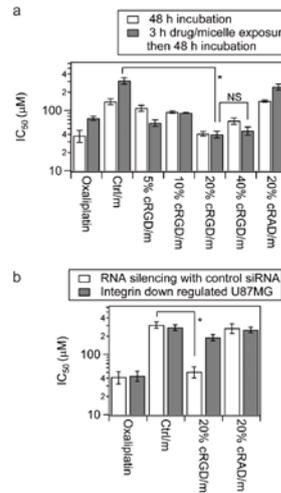


図 4. IC₅₀の変化。a) U87MG細胞に対する各ミセルとオキサリプラチンの細胞毒性。b) インテグリンをサイレンシングしたU87MG細胞に対する各ミセルとオキサリプラチンの細胞毒性。

細胞毒性試験の結果より、環状RGDを導入したミセルとリガンド未搭載のミセル(Ctrl/m)の間で活性に10倍近くの差があることが明らかとなった。特にミセルを細胞に短時間接触させた系に於いて顕著な有意差が確認された。また、インテグリンをサイレンシングした細胞を用いた場合は、この差が消失することから、これらの現象に環状RGDとインテグリンの作用が関与していると推察された。さらに、これらの実験によって、最適ナリガンド導入率が20%であることが明らかとなった。

(3) 抗腫瘍効果の確認

環状RGD導入による脳腫瘍の増殖抑制効果を明らかにするために、Ctrl/m、リガンド導入率が20%の環状RGDミセル、同環状RADミセルならびに低分子の白金抗がん剤であるオキサリプラチンをU87MG細胞を移植したマウスへ投与した。その結果、皮下移植モデル、同所移植モデルともに環状RGD導入ミセルに於いて優れた制がん活性を示すことが確認された(図5)。

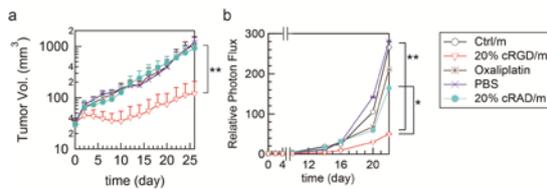


図 5. リガンド導入ミセルによるマウス脳腫瘍 U87MG モデルに於ける腫瘍増殖抑制試験 a) 皮下移植モデルを用いた実験. b) 同所移植モデルを用いた実験.

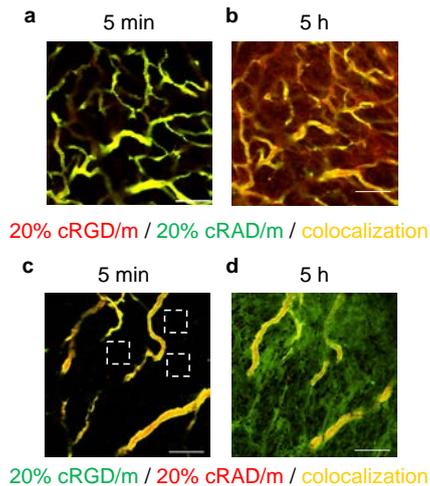


図 6. *In vivo* 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光ラベル化したミセルの脳腫瘍中での挙動. 20% cRGD/m (赤) と 20% cRAD/m (緑) を同時投与した場合; a) 投与後 5 分, b) 投与後 5 時間. 20% cRGD/m (緑) と 20% cRAD/m (赤) を同時投与した場合; c) 投与後 5 分, d) 投与後 5 時間.

さらに 20% cRGD/m と 20% cRAD/m を蛍光色素でラベル化して、*in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡にて腫瘍中に於ける各ミセルの腫瘍浸透性を確認した。その結果、投与直後の腫瘍血管は 20% cRGD/m (赤) と 20% cRAD/m (緑) の共局在によって黄色となっているが、時間経過とともに 20% cRGD/m が優先的に腫瘍内へ浸透し、5 時間後には腫瘍組織の深部にまで到達していることが確認された。一方で 20% cRAD/m (緑) の浸透は微弱であった (図 6a,b)。蛍光色素の色を交換して同様の実験を行った場合も、20% cRGD/m の優先的な腫瘍浸透性が確認されている (図 6c,d)。この結果は、環状 RGD の導入によって、薬物内包ミセルへ脳腫瘍の BTB を能動的に通過させる機能を付与できることを示している。また、これら環状 RGD 導入ミセルの腫瘍内への浸透がトランスサイトosis を経由して発現していることを示唆している。

以上のように、本研究では、最適量の環状 RGD をリガンド分子として導入した薬物内包ミセルが脳腫瘍の治療に非常に有用であることを見出している。また、同様の分子設

計は白金制がん剤のみならず、エピルビシンや核酸医薬など他の薬剤を内包したドラッグキャリアへも応用可能であることから、今後の研究により優れた脳腫瘍治療が実現されるものと考えられる。

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 11 件)

- 1) W. Kawamura, Y. Miura, D. Kokuryo, K. Toh, N. Yamada, T. Nomoto, Y. Matsumoto, D. Sueyoshi, X. Liu, I. Aoki, M. R. Kano, N. Nishiyama, T. Saga, A. Kishimura, K. Kataoka, Density-tunable conjugation of cyclic RGD ligands with polyion complex vesicles for the neovascular imaging of orthotopic glioblastomas. *Science and Technology of Advanced Materials* 16 035004 (2015). DOI: 10.1088/1468-6996/16/3/035004. [査読有]
- 2) H. Cabral, J. Makino, Y. Matsumoto, P. Mi, H. Wu, T. Nomoto, K. Toh, N. Yamada, Y. Higuchi, S. Konishi, M. R. Kano, H. Nishihara, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Systemic targeting of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers. *ACS Nano* 9 (5) 4957-4967 (2015). DOI: 10.1021/nn5070259. [査読有]
- 3) J. -Y. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* 39 23-30 (2015). DOI: 10.1016/j.biomaterials. 2014.10.069. [査読有]
- 4) H.-C. Yen, H. Cabral, P. Mi, K. Toh, Y. Matsumoto, X. Liu, H. Koori, A. Kim, K. Miyazaki, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled *in vivo* chemotherapy. *ACS Nano* 8 (11) 11591-11602 (2014). DOI: 10.1021/nn504836s. [査読有]
- 5) H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.-C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M. R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target

- preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation. *J. Control. Release* 189 1-10 (2014). DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.018. [査読有]
- 6) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.041. [査読有]
- 7) S. Quader, H. Cabral, Y. Mochida, T. Ishii, X. Liu, K. Toh, H. Kinoh, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release* 188 67-77 (2014). DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.048. [査読有]
- 8) Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* 8 (7) 6724-6738 (2014). DOI: 10.1021/nn500498t. [査読有]
- 9) Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 7 (10) 8583-8592 (2013). DOI: 10.1021/nn402662d. [査読有]
- 10) S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (41) 15501-15507 (2013). DOI: 10.1021/ja406406h. [査読有]
- 11) S. Wu, V. Kasim, M. R. Kano, S. Tanaka, S. Ohba, Y. Miura, K. Miyata, X. Liu, A. Matsubashi, U. -l. Chung, K. Kataoka, N. Nishiyama, M. Miyagishi, Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor HIF-1 α in a p53-independent manner. *Cancer Res.* 73 (6) 1787-1799 (2013) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0366. [査読有]
- [学会発表] (計 41 件)
- 1) Y. Miura, K. Kataoka, "Ligand-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anti-cancer drug into malignant tumor", The Drug Discovery & Therapy World Congress 2014, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center, Boston, Massachusetts, USA, June 18, 2014. (Invited Lecture)
- 2) J. -Y. Ahn, N. Yamada, A. Kim, T. Chida, Y. Miura, H. Cabral, Y. Matsumura, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Development of a specific targeting system for pancreatic tumors utilizing antibody conjugated Pt-loaded micelles", 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, The Hilton Chicago, Chicago, Illinois, USA, July 13, 2014.
- 3) H.-C. Yen, H. Cabral, H. Koori, Y. Miura, P. Mi, A. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Development of a glutathione sensitive polymeric micelles for the delivery of camptothecin to solid tumors", 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, The Hilton Chicago, Chicago, Illinois, USA, July 13, 2014.
- 4) A. Kim, Y. Miura, T. Ishii, K. Kataoka, "Efficient intracellular delivery of monoclonal antibodies into the living cells by charge-conversional polyionic complex micelles", 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, The Hilton Chicago, Chicago, Illinois, USA, July 14, 2014.
- 5) J. Makino, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, H. Kinoh, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Systemic targeting of lymph node metastasis by controlled design of drug-loaded polymeric micelles", 12th International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium (NanoDDS'14), UNC Eshelman School of Pharmacy and Duke University, North Carolina, USA, October 7, 2014.
- 6) H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y. Matsumoto, J. -Y. Ahn, H. Kinoh, N. Nishiyama, Y. Miura, K. Kataoka, "Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation", The 10th International Polymer Conference IPC2014, International Congress Center, Tsukuba, Ibaraki, December 3, 2014.

- 7) 三浦裕、川村涉、国領大輔、青木伊知男、安楽泰孝、岸村頭広、片岡一則、“環状 RGD 導入ポリオンコンプレックス型ベシクル(PICsome)の調製と新生血管ターゲティングによる脳腫瘍イメージング”、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県、2014 年 5 月 30 日
- 8) 三浦裕、辻厚至、国領大輔、青木伊知男、西山伸宏、片岡一則、“DOTA 残基を表面に有する高分子型ミセルの合成と腫瘍イメージングへの応用”、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県、2014 年 5 月 30 日
- 9) 三浦裕、J. -Y. Ahn、山田直生、西山伸宏、片岡一則、“抗体結合高分子型ミセルの開発と機能評価”、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県、2014 年 5 月 30 日
- 10) 三浦裕、H. Cabral、J. -Y. Ahn、M. Wang、牧野惇、H. Wu、鈴木利洋、田辺亜弥、西山伸宏、片岡一則、“高分子ミセル表層へのリガンド導入方法の開発と難治がん治療への展開”、第 63 回高分子討論会、長崎大学文教キャンパス、長崎市、長崎県、2014 年 9 月 25 日
- 11) 水野和恵、H. Cabral、三浦裕、西原広史、毛利普美、西山伸宏、片岡一則、“X 線照射後の腫瘍における白金製剤含有高分子ミセルの集積性の変化” 日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、2014 年 12 月 13 日
- 12) M. Wang, Y. Miura, H. Cabral, N. Nishiyama, H. Saya K. Kataoka, “Targeting cancer stem cells with platinum anti-cancer drug-incorporated polymeric micelles”, European Cancer Congress 2013, Avenue E. Mounier 83B-1200 Brussels, Belgium, September 28, 2013.
- 13) 三浦裕、山田直生、西山伸宏、片岡一則、“ペプチドリガンドを有するプラチナ制がん剤内包高分子型ミセルの開発と機能評価”、第 62 回高分子年次大会、京都国際会館、京都市、京都府、2013 年 5 月 29 日
- 14) M. Wang, 三浦裕、H. Cabral、西山伸宏、片岡一則、“Targeting cancer stem cells with platinum anti-cancer drug-incorporated polymeric micelles”、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ、京都市、京都府、2013 年 7 月 4 日
- 15) 三浦裕、山田直生、西山伸宏、片岡一則、“環状 RGD リガンドを有するプラチナ制がん剤内包ミセルの開発と悪性腫瘍への展開”、第 22 回ポリマー材料フォーラム、タワーホール船堀、江戸川区、東京都、2013 年 11 月 29 日
- 16) Y. Miura, A Jooyeon, N. Yamada, M. Wang, T. Chida, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, “Inhibition of

tumor growth by ligand-mediated drug delivery systems”, Nanobio FIRST International Symposium between Sweden and Japan Achieving medical innovation by nanobio Bench to Bedside, Bedside to Bench, Ito Hall, Ito International Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, March 5, 2013.

- 17) 三浦裕、H. Cabral、西山伸宏、片岡一則、“悪性脳腫瘍を標的としたリガンド介在型ドラッグデリバリーシステムの開発”、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道、2012 年 7 月 5 日

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 三浦裕、片岡一則、南山堂出版、「The Frontiers in Life Sciences シリーズ 生命科学から創薬へのイノベーション」、第 18 章「ドラッグデリバリー」、2014、128-135

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

名称：エピルピシン複合化ブロック共重合体と、ABC トランスポーター阻害剤とを含むミセル、及び当該ミセルを含む癌又は耐性癌、転移癌の治療に適用可能な医薬組成物
 発明者：喜納宏昭、片岡一則、H. Cabral、三浦裕、福島重人、西山伸宏、千田司
 権利者：国立大学法人東京大学、興和株式会社
 種類：特許権
 番号：特願 2014-163989
 出願年月日：2014 年 8 月 11 日
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：東京大学片岡研究室
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 裕 (MIURA, Yutaka)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40557980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし