

令和元年6月18日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05102

研究課題名(和文) がんの酸化ストレス耐性解除による合成致死戦略を基盤とする選択的がん治療薬の創製

研究課題名(英文) Development of tumor-selective drug based on synthetic lethal strategy by overcoming oxidative stress tolerance of cancer

研究代表者

永澤 秀子 (Nagasawa, Hideko)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90207994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞のストレス耐性を弱めて治療感受性を増強させるがん治療薬の創製を目指した。そこで、ミトコンドリア呼吸阻害、ROS 除去系の抑制またはストレス応答系を司るHIF-1シグナル及び小胞体ストレス応答(UPR)シグナル伝達系の抑制による酸化ストレスの活性化を誘導するがん治療薬の開発を行った。1) 低栄養環境選択的に強い細胞毒性を示す新規ビグアニド誘導体を開発した。2) 独自の二価鉄蛍光プローブを開発し、低酸素がん細胞における鉄レドックス平衡移動やフェロトーシスにおける二価鉄動態を可視化した。3) 難治性婦人科がんにおいて、フェロトーシス誘導剤が化学療法の効果を増強することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞がストレス環境に適応して生存するしくみに着目して、ストレス耐性を減弱させて治療抵抗性を改善するようがん治療薬の開発を目指した。特にがん細胞は、強い酸化ストレスにさらされながらも抵抗する仕組みをもっている。がん細胞のこのように劣悪な生存環境におけるストレス耐性を選択的に弱めることで、がん細胞選択的に障害を与えることができる。このようなくすりには、既存の癌治療法と併用することで、再発予防や予後の改善にも役立つと期待される。がんの罹患率が50%を越えた高齢化社会において希求されている、患者のQOLを損なわない新しいがん治療薬の開発に関する重要な知見が得られたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop therapeutic agents that reduce stress tolerance of cancer and induce cell death selectively in cancer. Strategies for suppression of oxidative stress resistance include inhibition of mitochondrial respiration, suppression of cellular antioxidant systems, and inhibition of HIF-1 signaling and unfolded protein response (UPR) signaling pathway. 1) We have developed novel biguanide derivatives that selectively show cytotoxicity under glucose-deprived conditions. 2) We succeeded to visualize the reductive shift of iron redox equilibrium in tumor cells under the hypoxic condition and the labile iron distribution during ferroptosis using our original ferrous iron fluorescent probe. 3) It has been found that ferroptosis inducers significantly sensitized the effects of chemotherapeutic agents for resistance ovarian cancer and uterine cancer.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：がん微小環境 酸化ストレス 小胞体ストレス応答 二価鉄 蛍光イメージング フェロトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで、がん微小環境における低酸素及び小胞体ストレスに対する適応応答システムを標的とするがん治療薬の開発研究を進めてきた。その結果、低酸素誘導因子(HIF)-1 阻害に基づく血管新生阻害剤や放射線または化学療法増感剤、低栄養選択的または低酸素選択的トキシシンなどの微小環境モジュレーターを開発してきた。(総説: Nagasawa, H., Surgery frontier, 2012, J. Pharm. Sci., 2011, Cancer Sci., 2009 等) これらの研究は、がん微小環境におけるストレス適応系を標的とする戦略に基づく。

本研究では、がんのストレス耐性を解除し、合成致死効果に導く選択的がん治療薬の創製を目指す。種々のストレスにさらされて生存するがん細胞は、がん抑制遺伝子の機能喪失性変異に基づく悪性形質転換のために、正常細胞では通常生存にかかわる機能を担ってはいない、「非がん遺伝子」に依存して生存していると考えられている。そこで、このようながんのストレス表現型で、「非がん遺伝子」による適応応答パスウェイを阻害すれば、合成致死効果によるがん細胞選択的な致死効果が得られると予想される。例えば、がん細胞及び正常形質細胞の酸化ストレス応答の違いを指標とするスクリーニングで見出されたピペロングミンは、がん細胞でのみ酸化ストレスを増強し、選択的な抗がん効果を示した。また、エラスチンは ras 変異がん細胞選択的にミトコンドリアの萎縮を伴う鉄依存的細胞死を引き起こし、この細胞死が鉄キレーターで抑制されたことから「フェロトシス」と呼ばれ、注目されている。これらの合成致死戦略に基づく新規抗腫瘍物質は、いずれもがん細胞の抗酸化防御機構を抑制しストレス耐性を解除して細胞死に導くことが明らかになっている。

2. 研究の目的

ある遺伝子 A が変異したがん細胞に対して、遺伝子 B を阻害すれば細胞が致死となる現象を合成致死という。複数のがん抑制遺伝子の変異による悪性形質転換のため、ストレス表現型を呈する難治性がんは、正常細胞には見られないストレス耐性機構を獲得することにより生存している。そこで本研究では、がんの酸化ストレス耐性を解除し、合成致死効果に導く選択的がん治療薬の創製を目指す。

3. 研究の方法

酸化ストレス耐性解除の戦略として、逆代謝リプログラミングまたはミトコンドリア阻害、ROS 除去系の抑制またはストレス応答系を司る転写因子 HIF-1 及び小胞体ストレス応答(UPR)系によるシグナル伝達系の抑制による ROS の活性化を誘導するがん治療薬の開発を行った。

1) 低栄養選択的細胞毒性評価による、ピグアニド系化合物の構造展開と作用機構解析研究

フォエフォルミンをリードとして芳香環置換基、塩基性官能基、アルキレンリンカー長などに関する構造展開を行い、低酸素応答プロモータールシフェラーゼアッセイ、GRP78 プロモーターアッセイ、グルコース欠乏培地および正常培地における細胞毒性を指標として、スクリーニングを行った。有望化合物について、フラックスアナライザーを用いたエネルギー代謝及び細胞死に関する解析、小胞体ストレス関連因子への影響の解析等を行った。

2) 二価鉄検出蛍光プローブによる、細胞内鉄代謝変動に基づく酸化ストレス応答の解析と二価鉄蛍光応答によるスクリーニング

新たに赤色蛍光を有する二価鉄蛍光プローブを開発し、これを用いて、がんの低酸素ストレス下における細胞内鉄レドクス変動の可視化を試みた。HepG2 細胞を 1%、5%及び 20%酸素下で培養し、上記のプローブで処理して蛍光イメージングを行った

酸化ストレス応答修飾作用物質のスクリーニングとして、独自の二価鉄蛍光プローブを用いて、HepG2 細胞における触媒活性鉄の増加や減少を指標とした化合物ライブラリースクリーニングを実施した。

3) フェロトシス誘導剤のエラスチン、アルテミシニン誘導體等による難治性婦人科がんに対する治療増感

難治性子宮頸癌に対する酸化ストレス耐性解除に基づく治療増感のために、各種細胞株におけるフェロトシス誘導剤エラスチン、アルテミシニン誘導體、スルファサラジン等の効果について解析した。

4. 研究成果

1) フェンホルミンをリードとしてピグアニド系化合物の構造展開を行った。スクリーニング系として、図 1 に示す低栄養、低栄養ストレス応答として HIF-1 応答ルシフェラーゼアッセイ及び UPR 応答ルシフェラーゼアッセイ系による評価と、HT29 細胞を用いた低グルコース細胞毒性試験によるスクリーニングを行った。結果、リードを上まわる強い低栄養選択的毒性、HIF-1 を有する複数の化合物 GPU-469, 529, 539 を得た。ピグアニド系化合物の構造活性相関として、芳香環へのハロゲンやメチル基の導入は置換位置に関わらず活性を増強した。芳香環及びピグアニド基へかさ高い置換基を導入すると活性は消失し、アルキレンリンカーサイズは C5 において最大の細胞毒性を示したが、低栄養選択性は減弱した。また、ピグアニド基は活性に必須だと考えられた。

GPU469(2-Cl-Phen)の作用機構の詳細な解析を行ったところ、グルコース及び血清欠乏培地に於いて、特異的にcMycタンパク発現、及びUPRの下流標的であるATF4、ATF6とGRP78を抑制した。さらに、小胞体関連分解(ERAD)成分のうちタンパク質品質管理の調節因子のHerp、GRP78、GRP94及びOD9タンパク質の発現を抑制することが明らかになった。以上により、本化合物は低栄養環境で、小胞体ストレス応答を破綻に導くことによって細胞死を誘導することが示唆された。

フェンホルミンにミトコンドリア電子伝達系酵素複合体(Complex I)阻害作用を有することが知られていることから、新規ビグアニド誘導体を用いて、異なるエネルギープロファイルを有するHT29、A549及びU87MG細胞の酸素消費速度(OCR)及び細胞外酸化速度(ECAR)への影響を調べた。グルコース存在下、いずれもフェンホルミンに比べ非常に強くOCRを抑制し、エネルギー代謝が解糖系にシフトした。一方、グルコース欠乏下では、OCRの抑制に加え、解糖系も抑制されたことから、エネルギー代謝全般が損なわれた。また、Annexin V染色によるFACS解析を行ったところ、これらの化合物は低グルコース培地で特異的に、アポトーシスを強く誘導した。以上により、本化合物は、低栄養・低酸素というがん微小環境において、好気呼吸阻害と同時にHIF-1シグナル阻害によって解糖系をも阻害し、加えて低栄養に対するUPRシグナルを抑制することによって、アポトーシスを誘導していることが示唆された。現在、本化合物の標的タンパク質を同定するための光反応性プローブの合成に取り組んでいる。

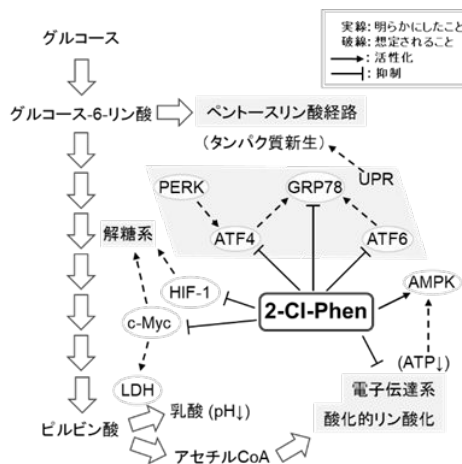


図1 ビグアニド誘導体の作用機構

2)

がんの低酸素ストレス下におけるHepG2細胞における細胞内鉄レドックス変動の解析を行った。我々が開発した赤色蛍光二価鉄蛍光プローブSiRhoNoxを用いて蛍光イメージングを行ったところ、酸素分圧および低酸素処理時間に依存して蛍光強度が増強し、これは二価鉄キレターのbipyridyl存在下では抑制された。一方、細胞内総鉄イオン量は変化しないことから、環境の酸素分圧変化に応じた細胞内のレドックス変動に、鉄イオンの酸化還元状態が関与していることが示唆された。さらに、スフェロイド培養系で同様のイメージングを行ったところ、スフェロイドの中心部分の低酸素領域(pimonidazole陽性)において、二価鉄蛍光の増強が認められた(図2)。がん微小環境の低酸素領域では鉄レドックス平衡が還元型にシフトしており、酸化ストレスのリスクが高まっていることが示唆された。

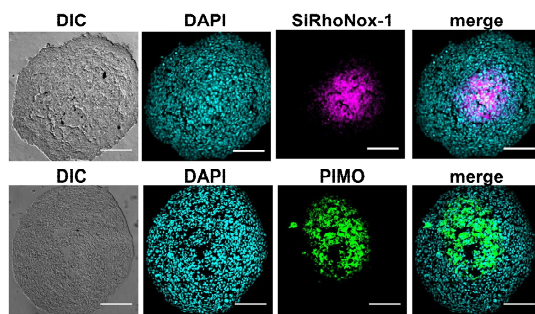


図2 HepG2スフェロイドにおける二価鉄イオンイメージング

そこで、より高感度な独自の二価鉄蛍光プローブを開発し、酸化ストレス応答修飾作用物質のスクリーニングとして、HepG2細胞における触媒活性鉄の増加や減少を指標とした化合物ライブラリースクリーニングを実施した。3400化合物のライブラリーから、複数の二価鉄誘導性または抑制性のヒット化合物が得られた。さらに詳細な二価鉄蛍光イメージング及び、細胞内鉄イオンの定量を行い、二価鉄を有意に誘導する候補化合物を選別した。現在、この化合物の作用機序を解析するため、各種鉄代謝関連タンパク質への影響等について解析を行っている。

Erastin誘導型フェロトーシスにおける鉄レドックス変動のライブセルイメージング解析を行った。ras変異細胞のHT1080及び野生型のMCF7細胞をerastinで処理して、鉄依存的細胞死(フェロトーシス)を誘導した。新たに開発したミトコンドリア、リソソーム及び小胞体局在型の二価鉄蛍光プローブミックスを用いて、二価鉄多色イメージングを行ったところ、erastin処理後、数時間でHT1080細胞では各小器官における蛍光強度の増大が認められ、これはDFO存在下で抑制された。一方、MCF7細胞では蛍光増強も細胞死も認められなかった。以上により、erastinによってras変異細胞で特異的に二価鉄が誘導され、それに続いて細胞死が引き起こされることが明らかになった。そこで、各種細胞小器官の二価鉄を同時にマルチ蛍光カラーイ

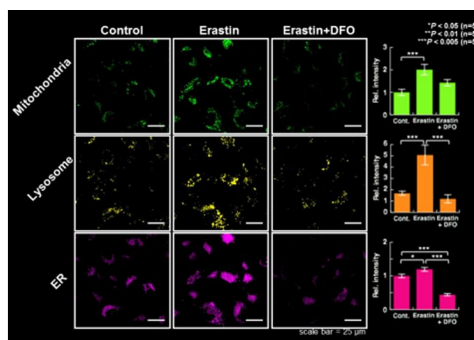


図2 HT1080細胞におけるerastin処理5時間後の二価鉄イメージング

メーキングする手法を確立し、フェロトシス誘導剤 (erastin など) 処理における二価鉄蛍光イメージングを行った結果、細胞死に先んじてリソソーム、ER において二価鉄が上昇し、これは細胞内鉄プール由来であることが明らかになった。本法は新たなフェロトシス検出方法として有効と考えられる。

3) 森重 (岐阜大学 医学部) らによる子宮頸癌手術検体の分析により、CD44v 及びシスチントランスポーターサブユニットの xCT の発現が予後や治療抵抗性と関連することが明らかになった。そこで、HeLa(CD44v-)及び CaSki(CD44v+)細胞に、erastin 及び xCT 阻害剤の sulfasalazine (SSZ)を単独または併用処理し、細胞毒性を調べたところ、CaSki 細胞は erastin 抵抗性だが、SSZ の併用によりフェロトシス誘導が増強された。これは高濃度の細胞内 GSH を SSZ によって抑制し、ROS 生成が増強されるためであることを明らかにした。以上により、CD44v 陽性の治療抵抗性子宮頸癌において、フェロトシス誘導治療が有効であることが示唆された。さらに、artesanate およびアルテミシニン誘導体が RAS 変異細胞の H1080 に特異的な細胞毒性を示し、この作用は鉄キレターで抑制されることがわかった。この際、artesanate により細胞内の二価鉄が有意に誘導されていることを明らかにした。一方 artesanate は、RAS 正常細胞の Hera 細胞に対しては全く効果を示さなかった。この結果、アルテミシニン誘導体はフェロトシス誘導作用を有することが明らかになった。こららの結果から、フェロトシス誘導剤と化学療法の併用により、治療抵抗性を克服できる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Oh-hashii Kentaro, Matsumoto Shiori, Sakai Takayuki, Hirata Yoko, Okuda Kensuke, Nagasawa Hideko, Effects of 2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide on ERAD Component Expression in HT-29 Cells Under a Serum- and Glucose-Deprived Condition, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 査読有, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-02969-4

Isono Aoi, Tsuji Mieko, Sanada Yu, Matsushita Akari, Masunaga Shinichiro, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko, Design, Synthesis, and Evaluation of Lipopeptide Conjugates of Mercaptoundecahydrododecaborate for Boron Neutron Capture Therapy, *ChemMedChem*, 査読有, 14 , 823-32, 2019. DOI:10.1002/cmdc.201800793

Hirayama Tasuku, Inden Masatoshi, Tsuboi Hitomi, Niwa Masato, Uchida Yasuhiro, Naka Yuki, Hozumi Isao, Nagasawa Hideko, A Golgi-targeting fluorescent probe for labile Fe() to reveal an abnormal cellular iron distribution induced by dysfunction of VPS35, *Chem. Sci.*, 査読有, 10, 1514-1521, 2019. DOI:10.1039/C8SC04386H

Hirayama Tasuku, Miki Ayaji, Nagasawa Hideko, Organelle-specific analysis of labile Fe() during ferroptosis by using a cocktail of various colour organelle-targeted fluorescent probes, *Metallomics*, 査読有, 11, 111-117, 2019. DOI:10.1039/C8MT00212F

Hirayama Tasuku, Kadota Satoki, Niwa Masato, Nagasawa Hideko, A mitochondria-targeted fluorescent probe for selective detection of mitochondrial labile Fe(), *Metallomics*, 査読有, 10, 794-801, 2018. DOI:10.1039/C8MT00049B

Takenaka Motoki, Suzuki Noriko, Mori Minako, Aoki Hitomi, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko, Morishige Ken-ichirou, Abstract 2322: Ferroptosis induced by erastin in RAS mutant ovarian cancer cells, *Cancer Research*, 査読有, 78, 2322-2322, 2018. DOI:10.1158/1538-7445.AM2018-2322

Niwa Masato, Hirayama Tasuku, Oomoto Ikumi, Wang Dan Ohtan, Nagasawa Hideko, Fe() Ion Release during Endocytotic Uptake of Iron Visualized by a Membrane-Anchoring Fe() Fluorescent Probe, *ACS Chemical Biology*, 査読有, 13, 1853-1861, 2018. DOI:10.1021/acscchembio.7b00939

Hirayama T., Mukaimine A., Nishigaki K., Tsuboi H., Hirosawa S., Okuda K., Ebihara M., Nagasawa H., Bismuth-rhodamine: a new red light-excitable photosensitizer., *Dalton Trans.*, 査読有, 46, 15991-15995, 2017. DOI: 10.1039/c7dt03194g

Oh-Hashi K., Matsumoto S., Sakai T., Nomura Y., Okuda K., Nagasawa H., Hirata Y., Elucidating the rapid action of 2-(2-chlorophenyl)ethylbiguanide on HT-29 cells under a serum- and glucose-deprived condition., *Cell Biol. Toxicol.*, 査読有, 1-12, 2017. DOI:10.1007/s10565-017-9410-0

Hirayama T., Tsuboi H., Niwa M., Miki A., Kadota S., Ikeshita Y., Okuda K., and Nagasawa H., A universal fluorogenic switch for Fe(II) ion based on N-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells, *Chem Sci*, 査読有, 8, 4858-4866, 2017. DOI:10.1039/C6SC05457A

Takenaka M., Suzuki N., Mori M., Hirayama T., Nagasawa H., and Morishige K., Iron regulatory protein 2 in ovarian endometrial cysts, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 487, 789-794, 2017. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.04.115

Hirayama T. and Nagasawa H., Chemical tools for detecting Fe ions, *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, 60, 39-48, 2017. DOI:10.3164/jcbn.16-70

Oh-Hashi K., Irie N., Sakai T., Okuda K., Nagasawa H., Hirata Y., Kiuchi K., Elucidation of a novel phenformin derivative on glucose-deprived stress responses in HT-29 cells, *Mol Cell Biochem*, 査読有, 419, 29-40, 2016. DOI:10.1007/s11010-016-2747-5

〔学会発表〕(計 18 件)

永澤秀子, 境 崇行, 小池晃太, 奥田健介, 平山祐, 辻美恵子, がん微小環境モジュレーターの新創出をめざす創薬研究, 日本薬学会第 139 年会, 2019.

Takayuki Sakai, Kentaro Oh-hash, Yoshiyuki Matsuo, Kiichi. Hirota, Kensuke Okuda, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, 第 11 回 日米癌合同会議(11th AACR JCA Joint Conference), 2019.

Hideko Nagasawa, Kota Koike, Masahiro Ebihara, Tasuku Hirayama, Mieko Tsuji, Structure-activity relationship study of quinomycin antibiotics focusing on cross-bridge structures of bicyclic depsipeptides to develop HIF-1 inhibiting antitumor agent, 第 11 回 日米癌合同会議(11th AACR JCA Joint Conference), 2019.

Kota Koike, Masahiro Ebihara, Tasuku Hirayama, Mieko Tsuji, Hideko Nagasawa, Development And Biological Evaluation Of Echinomycin Analogues For Antitumor Drug, 10th International Peptide Symposium, 2018.

永澤秀子, 小池晃太, 海老原昌弘, 平山祐, 辻美恵子, 架橋構造に注目したキノマイシン系抗生物質の構造展開と生物活性評価, 第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2018

丹羽 正人, 平山 祐, 大本 育美, 王 丹, 永澤 秀子, 細胞膜アンカリング型二価鉄イオン蛍光プローブによるトランスフェリン誘導型鉄 取り込みのリアルタイム可視化, 第 12 回バイオ関連化学シンポジウム, 2018.

大橋 憲太郎, 松本 詩織, 境 崇行, 平田 洋子, 奥田 健介, 永澤 秀子, 血清およびグルコース欠乏状態での小胞体関連分解因子におけるフェンホルミン誘導体の効果に関する研究, 第 24 回癌治療増感研究会, 2018.

平山祐, 丹羽正人, 永澤秀子, 細胞膜アンカリング型蛍光プローブによるエンドサイトーシス鉄取込過程におけるエンドソーム内二価鉄イオンの検出, 第 71 回日本酸化ストレス学会, 2018.

廣澤舟作, 丹羽正人, 平山 祐, 永澤秀子, 鉄制御分子の新創出を目指した二価鉄イオン蛍光プローブによるハイスループットスクリーニング, 日本薬学会第 138 年会, 2018.

森美奈子, 三木彩路, 平山 祐, 鈴木紀子, 永澤秀子, 森重健一郎, フェロトーシス誘導に基づくがん治療と鉄動態解析に関する研究, 酸化ストレス学会第 6 回東海支部会, 2018. Shiori Matsumoto, Takayuki Sakai, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, Yoko Hirata, Kentaro Oh-hash, Elucidation of a novel phenformin derivative on the glucose-deprived stress response in HT29 cells, 第 40 回分子生物学会年会, 2017.

境 崇行, 辻 美恵子, 平山 祐, 奥田健介, 永澤秀子, 低グルコース選択毒性を示す新規ピグアニド系抗腫瘍薬のエネルギー代謝に対する作用, 第 15 回がんとハイポキシア研究会, 2017.

丹羽正人, 平山 祐, 永澤秀子, 細胞質中での拡散性を示す鉄(II)イオン蛍光プローブの開発とその応用, 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2017.

境 崇行, 辻 美恵子, 平山 祐, 奥田健介, 永澤秀子, がん微小環境における低栄養ストレス応答を標的とするピグアニド誘導体の創薬研究, 第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2017.

Hideko Nagasawa, Kota Koike, Kozo Hattori, Kensuke Okuda, Tasuku Hirayama, 26th French-Japanese Symposium on Medicinal & Fine Chemistry, 2017.

境 崇行, 平山 祐, 辻 美恵子, 永澤秀子, がん微小環境のエネルギー代謝を標的とするがん治療薬の開発, 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2017.

松本詩織, 入江菜央, 境 崇行, 奥田健介, 永澤秀子, 木内一壽, 平田洋子, 大橋憲太郎, ヒト結腸癌細胞株 HT29 におけるグルコース欠乏性ストレス応答に対する新規フェンホルミン誘導体の効果に関する研究, 第 81 回日本生化学会中部支部例会, シンポジウム, 2017.

Tasuku Hirayama, Masato Niwa, Satoki Kadota, Ayaji Miki, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, Molecular imaging of iron metabolism during ferroptosis with a novel mitochondria-targeting fluorescent probe, 2016 World Molecular Imaging Congress, 2016.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：抗腫瘍効果を有する化合物及び製造方法
発明者：永澤秀子、平山祐、小池晃太
権利者：永澤秀子、平山祐、小池晃太
種類：特許
番号：特願 2018-2221124
出願年：2018
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/yakka/>
6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平山 祐
ローマ字氏名：Hirayama Tasuku
所属研究機関名：岐阜薬科大学
部局名：薬化学研究室
職名：准教授
研究者番号(8桁): 10600207

研究分担者氏名：奥田 健介
ローマ字氏名：Kensuke Okuda
所属研究機関名：神戸薬科大学
部局名：薬化学研究室
職名：教授
研究者番号(8桁): 00311796

研究分担者氏名：辻 美恵子
ローマ字氏名：Tsuji Mieko
所属研究機関名：岐阜薬科大学
部局名：薬化学研究室
職名：助教
研究者番号(8桁): 40709721

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。