

令和元年5月20日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09359

研究課題名(和文) レチノイドによる新たな発現制御メカニズムを介した肝癌抑制作用の解明

研究課題名(英文) Retinoid-Mediated Suppression of Hepatocellular Carcinoma Invasion through a Novel Regulatory Mechanism of Gene Expression

研究代表者

土谷 博之 (Tsuchiya, Hiroyuki)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00403402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：レチノイドはTFPI2(tissue factor pathway inhibitor 2)の発現誘導により肝細胞癌の転移を抑制していることを明らかにした。さらにレチノイドはレチノイン酸受容体(RAR)を介してTFPI2を発現誘導すること明らかにした。さらにこのRARの働きを、musculoaponeurotic fibrosarcoma(MAF)ファミリーに属する転写因子MAFBとMAFFが、それぞれ正と負に制御していることを明らかにした。さらにTFPI2やMAFB、MAFFの発現量は肝癌患者の予後を規定することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでレチノイドとTFPI2が癌細胞浸潤を阻害することは知られていたが、両者を関係づけた本研究が初めてである。またMAFファミリーについても同様である。これによってレチノイドによる新たな抗腫瘍作用とそのメカニズムが明らかになった。さらに、これまで申請者を含め数多くの研究グループがレチノイドの優れた有効性を報告してきたが、レチノイドに伴う許容しがたい副作用はその有効性を損なう大きな障害となっている。そのため本研究で明らかになったメカニズムを利用し、レチノイドに伴う副作用を回避したより特異性の高い治療薬の開発への展開が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Retinoids exert antitumor effects mainly through retinoic acid receptor (RAR). In the present study, I identified the factors involved in the RAR-mediated transcriptional regulation of the tumor suppressor gene, tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2), in hepatocellular carcinoma (HCC). All-trans-retinoic acid (ATRA) significantly increased TFPI2 expression through RAR in a human HCC cell line. TFPI2 was vital in the ATRA-mediated suppression of HCC cell invasion. Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (MAFB) significantly enhanced the activation of the TFPI2 promoter via RAR, while MAFF inhibited it. Patients with HCC expressing low MAFB and high MAFF levels showed the shortest disease-free survival time. These results suggest that MAFB and MAFF play critical roles in the antitumor effects of retinoids by regulating the expression of retinoid target genes, such as TFPI2, and can be promising in the development of therapies to combat HCC invasion.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝細胞癌 レチノイド 癌細胞浸潤 RAR TFPI2 MAFファミリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌抑制遺伝子としての TFPI2 TFPI2 は組織因子/第VIIa 因子複合体や、トリプシン、プラスミンのプロテアーゼ活性を阻害する分泌タンパク質である (PNAS 1994, BBRC 1999)。そのため血液凝固制御に加え、肝癌などにおいて細胞浸潤抑制作用 (Hepatology 2007, Anat Rec 2013) や血管新生抑制作用 (Cancer Res 2014, Oncotarget 2015) が報告されている。また詳細なメカニズムは不明であるが、肝癌細胞の増殖抑制作用や抗癌剤感受性増強作用も報告されている (Hepatology 2007, Anat Rec 2013)。このような機能と一致して、肝癌など種々の癌組織では TFPI2 遺伝子のエピジェネティックなサイレンシングが報告されている (Oncogene 2005, Oncogene 2005, Br J Cancer 2005, Hepatology 2007, Dig Dis Sci 2013)。

(2) 肝臓における MAF の生理機能 MAF ファミリー転写因子は、MAF、MAFA、MAFB などの分子量の大きな群 (L-MAF) と、MAFF、MAFG、MAFK など分子量が小さい群 (S-MAF) に大別される。両群ともに MAF 認識配列 (MARE) に結合し自身または他の転写因子と二量体を形成するが、S-MAF 群は転写活性化ドメインを欠損しているため、二量体のパートナーによって転写を正負両方に制御する。肝癌との関係はまだ明らかではないが、成体の肝臓において S-MAF 群因子は、酸化ストレス応答や異物代謝、脂質代謝などを制御している (BBA 2012)。また、MAF と MAFG は胆汁酸代謝を制御することも報告されている (Hepatology 2010, Cell Metab 2015)。

(3) 肝癌におけるレチノイドの意義 申請者はこれまで、肝臓における核内受容体の病態生理学的意義について研究を行い、その多彩な機能の一端を解明してきた (Hepatology 2015, Gastroenterology 2015, Metabolism 2013, Obesity 2013)。特にレチノイドに関する研究では、RAR の活性化によって、肝発癌の危険因子でもある肝鉄過剰蓄積やインスリン抵抗性が改善することを明らかにした (Gastroenterology 2009, Hepatology 2012)。一方、他の研究グループは、合成レチノイドであるペレチノインが肝細胞癌の再発抑制作用を持つことを、臨床試験で明らかにしている (J Gastroenterol 2015)。さらに肝癌以外の癌では、レチノイドによる MMP や TIMP の発現制御を介した癌細胞の浸潤抑制作用 (Ann N Y Acad Sci 1999, Breast Cancer Res Treat 2003, Nutr Cancer 2007) や、VEGF 発現阻害などによる血管新生抑制作用 (Cancer Lett 1995, Auris Nasus Larynx 2003, Oncol Res 2004) も報告されている。

(4) レチノイドによる TFPI2 遺伝子発現誘導 レチノイドと TFPI2 との関係はこれまで不明であったが、申請者は最近、TFPI2 が肝癌細胞におけるレチノイド標的遺伝子であることを見出した。

最もよく知られたレチノイド標的遺伝子の一つである RAR β 遺伝子の発現制御は、一般的なレチノイドによる発現制御メカニズムとして広く知られている。しかし申請者の研究により、HuH7 を初めほとんどの肝癌細胞株はレチノイドによって RAR β とともに TFPI2 を発現誘導するが、HepG2 は RAR β のみを発現誘導し、TFPI2 は発現誘導しないことがわかった。またこの現象は TFPI2 のエピジェネティック制御とは無関係であった。そこで「HuH7 または HepG2 特異的に発現している転写制御因子が、レチノイドによる TFPI2 発現誘導を規定している」と仮定して研究を行ったところ、HuH7 は L-MAF (MAF) を、HepG2 は S-MAF (MAFK) を、それぞれ優位に発現していることが判明し、さらに RAR α による TFPI2 プロモーター活性化作用を、L-MAF (MAF) は増強し、S-MAF (MAFG) は抑制することを申請者は明らかにした。

以上のことから、TFPI2 はレチノイドによる抗腫瘍作用の一部を担っていることが想定された。さらに、レチノイドによる TFPI2 発現誘導メカニズムの解明とその標的遺伝子の同定によって、肝癌制御につながる新たな医薬イノベーションの創出が期待できると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

申請者は、癌抑制遺伝子 TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 2) が、肝癌細胞におけるレチノイド標的遺伝子であることを発見した。さらに、このレチノイドによる TFPI2 発現誘導には、RAR (レチノイン酸受容体) とともに転写因子 MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma) が関与している可能性を見出した。そこで本研究では、レチノイドと MAF による新たな発現制御メカニズムと、これを介した肝癌抑制作用の解明を目的に、以下の項目について検討を行う。

- (1) レチノイドによる MAF ファミリーを介した TFPI2 発現制御メカニズムの解明
- (2) レチノイドによる TFPI2 を介した癌細胞浸潤・血管新生に対する阻害作用
- (3) レチノイドと MAF ファミリーの肝癌における病態生理学的意義の解明

(1) レチノイドによる MAF ファミリーを介した TFPI2 発現制御メカニズムの解明

まず TFPI2 プロモーター領域に存在する、発現制御に必要な不可欠な RAR α や L/S-MAF の認識配列を同定する。次に、この認識配列への両転写因子の結合や、RAR α と L/S-MAF の直接的な相互作用、さらにはこれらに対するレチノイドの影響について明らかにする。

(2) レチノイドによる TFPI2 を介した癌細胞浸潤・血管新生に対する阻害作用

ここでは TFPI2 や L/S-MAF を遺伝子改変した癌細胞株を使って、レチノイドによる L/S-MAF や TFPI2 を介した肝癌細胞の浸潤および血管新生に対する抑制作用を検証する。

(3) レチノイドと MAF ファミリーの肝癌における病態生理学的意義の解明

実験(2)で、レチノイドや L/S-MAF と細胞浸潤および血管新生との関係について検討しているが、一般的に転写因子は多数の標的遺伝子を介して様々な生理的機能に関与している。TFPI2 のように、L/S-MAF に依存して発現制御されるレチノイド標的遺伝子(これを Maf-dependent Retinoid target Genes; MRG とする)は、癌治療の標的分子や予防のための診断マーカーといった医薬品開発への応用が期待できる。そこでまず網羅的解析により肝臓における MRG を同定する。次に肝癌検体における MRG の発現量を調べ、肝発癌に伴う発現変化を明らかにする。最後に発現変化のあった MRG について、癌と関連する機能が報告されているものを選択し、その機能を検証する。

3. 研究の方法

MAF ファミリーは、L-MAF と S-MAF、それぞれの群内で一部重複した機能を持つことが知られている。少なくとも *in vitro* 実験では、MAF ファミリーの MARE 結合能はほぼ同程度であり、各メンバーの機能は同じ群内のメンバーで互換できることが示されている (J Biochem 2007)。そこで本研究で行う過剰発現実験では、実際に肝臓で生理機能を持つ MAF および MAFG を、それぞれ L-MAF 群と S-MAF 群の代表として用いる (Hepatology 2010, Cell Metab 2015)。また本研究では、レチノイドとして all-trans-レチノイン酸 (ATRA) を全ての実験で使用する。

(1) レチノイドによる MAF ファミリーを介した TFPI2 発現制御メカニズムの解明

一般に RAR と MAF は、それぞれ RARE、MARE と呼ばれる高度に保存されたコンセンサス配列に結合し、その下流にある遺伝子の発現を誘導する。任意のゲノム領域に存在する RARE と MARE は、web 上で公開されているプログラムを使ってある程度予測することができるが、申請者の行った検討では TFPI2 遺伝子プロモーターには MARE のみが予測され、RARE は検出されなかった。また MAF ファミリーは MARE 上でヘテロダイマーを形成する (Diabetes Metab Res Rev 2015) ことなどから、図 3 に示したように RAR は、TFPI2 プロモーターの MARE 上に存在する L-MAF と、レチノイド依存的に結合することで TFPI2 を発現誘導し、一方、S-MAF とは、RAR は結合できないか、結合しても何らかのメカニズムにより RAR の転写活性化能が阻害されてしまう、という仮説を立て、以下のような実験を計画した。

まず、ルシフェラーゼベクターに組込んだ TFPI2 プロモーターの MARE に変異を導入し、RAR α や MAF、MAFG によるプロモーター活性化制御を検討する。これにより予測された MARE が実際に機能することを確認する。さらに、クロマチン免疫沈降により RAR α や MAF、MAFG の MARE への結合を、免疫沈降法により RAR α と MAF または MAFG との結合を、それぞれ検証し、同時に ATRA 存在下における両結合の変化についても定量的に明らかにする。

これらの実験で期待通りの結果が得られない場合は、RAR α と L/S-MAF は結合せず、それぞれ別々の塩基配列を独自に認識している可能性が高い。このような場合は、TFPI2 プロモーターを数十塩基ずつ短くしたルシフェラーゼベクターのシリーズを作製し、領域を絞り込むことによって、RAR α と L/S-MAF それぞれの結合配列を決定する。

(2) レチノイドによる TFPI2 を介した癌細胞浸潤・血管新生に対する阻害作用

TFPI2 に対する shRNA 発現ベクターを作製し、HuH7 へ遺伝子導入することで、TFPI2 発現が安定にノックダウンされた細胞株 (H7-TKD) を構築する。また上記のように、HuH7 は MAF (L-MAF) を、HepG2 は MAFK (S-MAF) を、それぞれ優位に発現している。そこで、MAFG を安定に過剰発現する HuH7 (H7-G) と、MAF を安定に過剰発現する HepG2 (G2-M) をそれぞれ作製し、さらに ATRA 処理を行い、H7-G では TFPI2 が発現誘導されず、G2-M では発現誘導されることを確認する。

ここで期待通りの発現変化が認められない場合、H7-G と G2-M で元々発現している内在性の L/S-MAF による競合的な阻害が考えられるため、shRNA 発現ベクターによって H7-G の MAF と、G2-M の MAFK をさらにノックダウンする。

次に、これらの各肝癌細胞株 (HuH7、HepG2、H7-TKD、H7-G、G2-M) を使って、トランスウェルによる細胞浸潤アッセイを行う。まずマトリゲルでコートした上側チャンバーで各肝癌細胞株を無血清培地で培養し、下側チャンバーには細胞浸潤を誘導するため血清含有培地を加え、各細胞株の浸潤細胞数を測定・比較する。さらに ATRA による浸潤細胞数の変化についても検討し、レチノイドおよび L/S-MAF による TFPI2 を介した癌細胞浸潤抑制作用メカニズムを実証する。

続いて、TFPI2 が分泌タンパク質であることを利用し、下側チャンバーで各肝癌細胞株を、上側チャンバーでヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を、それぞれ培養する。浸潤誘導因子の VEGF と共に ATRA を添加し、浸潤細胞数を測定する。これによりレチノイドと L/S-MAF による TFPI2 を介した血管内皮細胞浸潤に対する抑制作用メカニズムを実証する。また、HUVEC を線維芽細胞と共培養し血管腔形成を誘導する。そこに ATRA と各肝癌細胞株の培養上清を加えることで、血管腔形成に対する影響についても検討する。

レチノイドおよび TFPI2 とともに、細胞浸潤や血管新生に対し抑制的に作用することは、個々にはあるがすでに報告されている。またここでのアッセイはすべて市販のキット製品で行う予定である。そのためここでの実験で大きな問題は生じないものと考えられる。

(3) レチノイドと MAF ファミリーの肝癌における病態生理学的意義の解明

2 μ M ATRA で 12 時間処理した HuH7、HepG2、H7-G、G2-M について、次世代シーケンサーによる網羅的発現解析を行う。HuH7 と H7-G、HepG2 と G2-M を比較し、TFPI2 のように、①MAF や MAFG によって ATRA に対する応答性が変化する遺伝子を同定する。次に、ATRA 処理した H7-G と G2-M のクロマチンを、それぞれ MAFG および MAF の抗体で免疫沈降し、回収されたクロマチン DNA を次世代シーケンサーで解析する。この解析結果から、②レチノイド依存的に MAF または MAFG が結合するゲノム領域の近傍に存在する遺伝子を同定する。

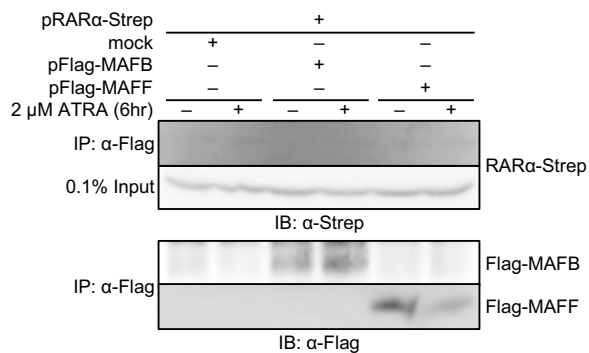
解析結果①②に共通して同定された遺伝子を、“L/S-MAF に依存して発現制御されるレチノイド標的遺伝子” (Maf-dependent Retinoid target Genes; MRG) とし、続いて、MRG の肝癌に伴う発現変化を、医薬基盤研究所の疾患ゲノムデータベース (GeMDBJ) に登録されている網羅的発現解析データ (ヒト正常肝 41 検体、肝細胞癌 54 検体) で調べる。肝癌でその発現量に大きな変化があった MRG について、癌組織アレイを使って免疫染色を行いマイクロアレイデータの再現性を確認する。再現性が確認された MRG について過去の文献を調査し、癌と関連性のある機能を持つことが示唆された MRG を抽出する。可能であればこの MRG うち複数個を選択し、cDNA または shRNA の発現ベクターを作製する。このベクターを使って HuH7 または HepG2 で過剰発現・ノックダウン実験を行い、細胞増殖、アポトーシス、細胞周期、細胞浸潤、血管新生等に与える影響について検討を行う。

ここでは網羅的解析を主としており、さらに申請者はその技術を習得しているため、実験の進行を妨げる大きな問題は特に生じないと考えられる。

4. 研究成果

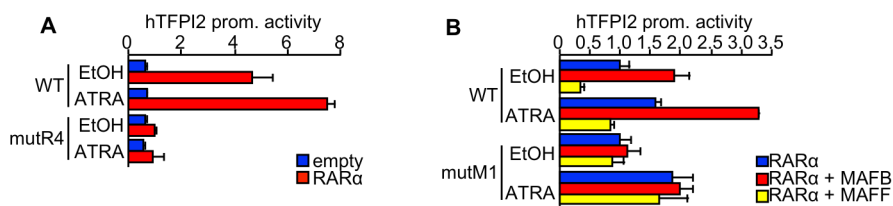
(1) RAR α と MAFB、MAFF との相互作用

レチノイン酸受容体 (RAR) α と musculo-aponeurotic fibrosarcoma (MAF) B、MAFF の相互作用を調べるため、Strep タグ融合 RAR α 、FALG タグ融合 MAFB、FALG タグ融合 MAFF、それぞれの発現ベクターを作製し、それぞれのタグ抗体を使って免疫沈降ウェスタンブロット (IP-WB) を行った。トランスフェクション時間や細胞株を変え様々な条件で IP-WB を行ったが、両者の相互作用は認められなかった (右図)。また all-*trans*-レチノイン酸 (ATRA) を添加した条件でも検討を行ったが、両者の結合は観察されなかった。このことから RAR α と MAFB、MAFF は、細胞内で直接は結合していない可能性が示唆された。

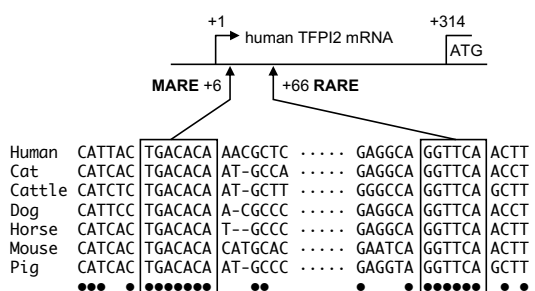


(2) TFPI2 プロモーター制御メカニズム

TFPI2 遺伝子プロモーターの塩基配列を精査したところ、MAF 認識配列が数カ所予測された。また申請書に記載の通り RAR 認識配列は見つからなかったが、RAR は RGKTCA からなるハーフサイトが 2 回繰り返す塩基配列に好んで結合することが知られている。そこで再度 TFPI2 プロモーターの塩基配列を精査し直したところ、上記のハーフサイトが 2 箇所予測された。そこで、TFPI2 プロモーターのレポーターベクターの、予測されたそれぞれの認識配列に、部位特異的変異導入法で変異を導入したミュータントレポーターベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った (右図)。その



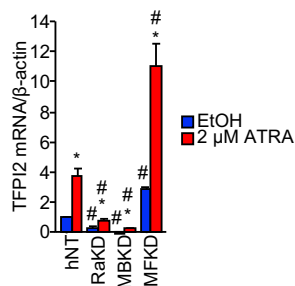
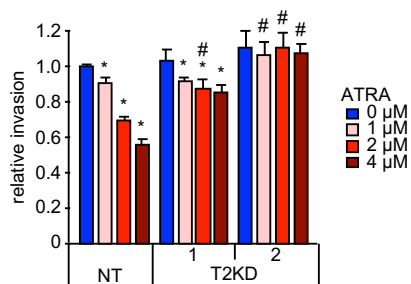
結果、転写開始点から 6 塩基下流に MAF 認識配列が、66 塩基下流に RAR 認識配列が、それぞれ存在することが明らかとなった。さらにこれらの認識配列は種間で高度に保存されていた (右図)。これらの結果から、MAFB および MAFF は、RAR α と直接相互作用はしないものの、標的遺伝子のプロモーターを介して、RAR α をそれぞれ活性化、抑制していることが明らかとなった。



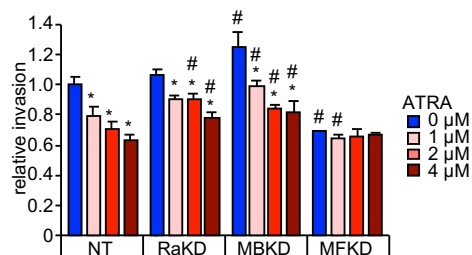
(3) TFPI2 を介した肝癌細胞の浸潤抑制メカニズム

上記で明らかになった、TFPI2 の遺伝子発現に関わる転写因子 RAR α 、MAFB、MAFF が、癌細胞の浸潤能を実際に制御していることか検討を行った。まず、TFPI2 に対する short hairpin (shRNA)

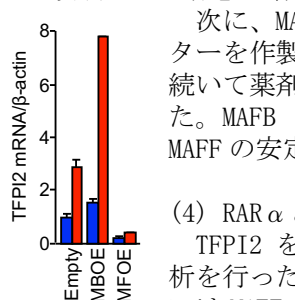
発現ベクターを肝癌細胞株に導入し、TFPI2 遺伝子の発現がノックダウン(発現抑制)された細胞 (T2KD-1, -2) を得た。その結果 TFPI2 のノックダウンにより ATRA による浸潤抑制作用が消失した(右図)。このことから ATRA は TFPI2 依存的に癌細胞の浸潤を抑制していることが示唆された。



続いて RAR α 、MAFB、MAFF を shRNA によりノックダウンした細胞株を得た。これらの細胞で TFPI2 の遺伝子発現量を調べたところ、RAR α あるいは MAFB のノックダウンにより TFPI2 の発現量は有意に低下した。一方、MAFF のノックダウンにより TFPI2 の発現は有意に上昇した(左図)。



次にトランスウェルを使って癌細胞の浸潤活性を調べたところ、レチノイドによる浸潤活性抑制効果は、TFPI2、RAR α 、MAFB のノックダウンによって有意に阻害された(右図)。一方、MAFF のノックダウンは、ATRA とは無関係に癌細胞浸潤活性を有意に増強した。



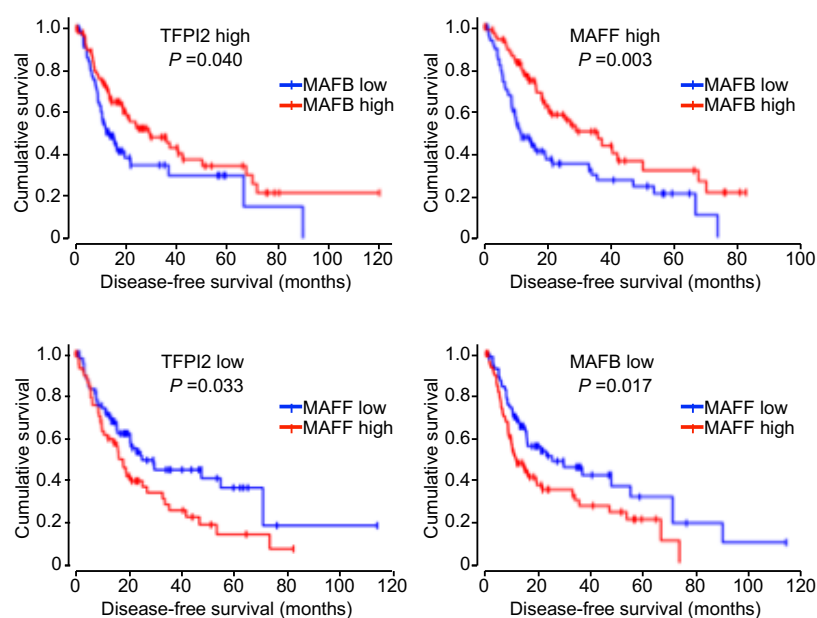
次に、MAFB および MAFF の発現ベクターを作製し、肝癌細胞株に導入した。続いて薬剤選択を行い、安定的に MAFB あるいは MAFF を過剰発現する細胞株を得た。MAFB を安定的に過剰発現した細胞では TFPI2 の発現が有意に亢進し、一方、MAFF の安定発現細胞における TFPI2 の発現は有意に抑制されていた(左図)。

(4) RAR α と MAFB、MAFF によるトランスクリプトーム制御

TFPI2 をノックダウンした細胞株でマイクロアレイ解析を行い、パスウェイ解析を行った結果、細胞運動や血液凝固関連経路に異常を認めた。さらに MAFB あるいは MAFF をノックダウンした細胞のマイクロアレイ解析結果より、MAFB と MAFF はレチノイド代謝およびアディポカインシグナル経路において相反する機能を持つことが示唆された。

(5) 肝細胞癌患者の予後との相関

TCGA にて公開されている肝細胞癌患者の生存期間とトランスクリプトーム解析結果を検討したところ、TFPI2 発現が高い患者では MAFB の発現量が高いと生存期間が有意に長く、TFPI2 発現が低い患者では MAFF の発現量が高いと生存期間が有意に短くなった(右図)。



さらに MAFF が高い患者では MAFB の発現量が高いと生存期間が有意に長く、MAFB が低い患者では MAFF の発現量が高いと生存期間が有意に短くなる(右図)。

これらの結果より、TFPI2 や MAFB、MAFF の発現量は肝癌患者の予後を規定することが明らかになった。さらに MAFB と MAFF は相反する機能を持つことが、実際の肝細胞癌患者においても示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ryoma Asai, Hiroyuki Tsuchiya, Masataka Amisaki, Kazuki Makimoto, Ai Takenaga, Tomohiko Sakabe, Shotaro Hoi, Shigemi Koyama, Goshi Shiota. CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Med*, 査読有, 2019, 8, 773-782.

DOI: 10.1002/cam4.1968

- ② Masataka Amisaki, Hiroyuki Tsuchiya, Tomohiko Sakabe, Yoshiyuki Fujiwara, Goshi Shiota, Identification of genes involved in the regulation of Telomerase Reverse Transcriptase in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci, 査読有, 2019, 110, 550-560
DOI: 10.1111/cas.13884
- ③ Hiroyuki Tsuchiya, Seiya Oura, Involvement of MAFB and MAFF in Retinoid-Mediated Suppression of Hepatocellular Carcinoma Invasion. Int. J. Mol. Sci., 査読有, 2018, 19, 1450.
DOI: 10.3390/ijms19051450

[学会発表] (計8件)

- ① 土谷博之、汐田剛史、肝癌幹細胞における長鎖非コードRNA NEAT1の機能解析、第54回日本肝臓学会総会、2018年
- ② 土谷博之、朝井良磨、汐田剛史、CRISPR/Cas9によるノックアウトを用いたCD44sの肝癌幹細胞における機能解析、第54回日本肝臓学会総会、2018年
- ③ 土谷博之、汐田剛史、肝癌幹細胞における長鎖非コードRNA NEAT1の機能解析、第54回日本肝臓学会総会、2018年
- ④ 土谷博之、朝井良磨、汐田剛史、CRISPR/Cas9によるノックアウトを用いたCD44sの肝癌幹細胞における機能解析、第54回日本肝臓学会総会、2018年
- ⑤ 土谷博之、網崎正孝、本城総一郎、汐田剛史、HBV関連肝細胞癌におけるHBxによるc-MYCを介したURI1発現誘導メカニズム、第29回日本消化器癌発生学会総会、2018年
- ⑥ 土谷博之、大橋一夫、新規転写制御メカニズムを介したレチノイドによる肝癌細胞浸潤抑制作用、第52回日本肝臓学会総会、2016年
- ⑦ 土谷博之、大浦聖矢、大橋一夫、レチノイドによる新規転写制御メカニズムを介した肝癌細胞浸潤抑制作用、第12回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、2016年
- ⑧ 土谷博之、大橋一夫、レチノイドによる新規転写制御メカニズムを介した肝癌細胞浸潤抑制作用、第75回日本癌学会学術総会、2016年

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：肝癌のテロメラーゼ逆転写酵素の遺伝子発現レベルを制御する薬剤のスクリーニング方法および診断キット

発明者：汐田剛史、網崎正孝、坂部智彦、土谷博之

権利者：国立大学法人鳥取大学

種類：特許

番号：特願 2018-074291

出願年：平成 30 年

国内外の別： 国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※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。