

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04059

研究課題名(和文)革新的質量分析法を用いた悪性中皮腫診断マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of Diagnostic Markers for Malignant Mesothelioma Using Innovative Mass Spectrometry

研究代表者

鶴山 竜昭 (Tsuruyama, Tatsuaki)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究員

研究者番号：00303842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫のホルマリン固定組織の液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)により突然変異遺伝子座として報告された RhoA、ビジリンなどの小胞体関連タンパク質、PRDX4 などの酸化制御タンパク質、ユビキチン E3 リガーゼが、MMで有意に高いことを明らかにした。93例のMM(類上皮71症例、肉腫様13症例、二相性9症例)および124例の肺癌症例、および14例のNMの免疫組織化学ではRhoA、ビジリンは、類上皮悪性中皮腫で陽性、PRDX4 およびユビキチン E3 リガーゼが、多くのMM、肺癌で陽性であった。病因を示唆し、診断にも有用な情報が多く得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫の腫瘍発生に関する病因はいまだ明確でなく、その早期診断マーカーや治療の早期開発が強く望まれている。今回の研究で、活性酸素、プロテアソーム、小胞体ストレスに関するタンパク質の発現の増加が悪性中皮腫で顕著であり、その腫瘍発生メカニズムの概観が可能になった。また治療法開発についても酸化ストレス、プロテアソーム、小胞体ストレスの関連分子を標的とした新たな方法の開発の有効性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We extracted proteins from 24 tissue sections collected from epithelioid malignant pleural mesothelioma (EMPM) and normal mesothelial cells (NM). The abundance of individual proteins in each tissue sample was assessed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). RhoA, a highly susceptible mutation locus, were significantly higher in EMPM than in NM tissues. Besides, endoplasmic reticulum related proteins, including vigilin and redox-oxidation control proteins including PRDX4, and ubiquitin E3 ligase, were significantly higher in EMPM than in NM tissues. Immunohistochemistry (IHC) of 93 MM (epithelioid, 71 cases; sarcomatoid, 13 cases; biphasic, 9 cases), 64 lung adenocarcinoma (LAC), 60 lung squamous cell carcinoma (LSC), and 14 NM tissues was performed. RhoA and vigilin revealed positivity of EMPM, and PRDX4 and ubiquitin E3 ligase were positive in most MMs and the majority of LAC and LSC. This profiling suggests that the stress-induced reaction relates to MM pathogenesis.

研究分野：病理学

キーワード：悪性中皮腫 質量分析 タンパク質 バイオマーカー

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、体腔の内面を覆う漿膜の中皮細胞に由来する腫瘍であり、悪性度が高く、早期診断が必要な疾患であるにもかかわらず、病態がいまだ不明な点も多く、さらなる診断方法の開発、臨床研究が強く望まれている。アスベストへの暴露は、悪性中皮腫発症の病因因子であることが疫学的に証明されており、日本では、アスベストが、工場労働者および職業暴露歴のない一般市民にも悪性中皮腫の罹患に影響を与えると報告されている。日本の厚生労働省によると、日本におけるアスベスト関連の死亡者数は、2005年の500人から2014年には1400人へと3倍になった。悪性中皮腫の臨床診断には、アスベストへの患者の暴露歴の包括的な分析、画像ベースの診断が必要である。しかしながら、日本肺癌学会「悪性胸膜中皮腫病理診断の手引き」の指摘にあるように、中皮腫の確定診断までに非常に時間がかかり、患者の治療が遅れていることが指摘されている。病理診断に必要な腫瘍マーカーや悪性中皮腫特異的タンパク質はまだ特定されておらず、標準化された生化学検査による腫瘍の診断は困難である。また、悪性中皮腫と胸膜炎、卵巣癌、肺腺癌(肺腺癌)、肉腫様癌、胸膜炎と、悪性中皮腫の鑑別診断を行うことも困難である。さらに、組織学的に多様な腫瘍のサブタイプにより、診断に時間がかかる場合が多い。悪性中皮腫の発症には、アスベストに含まれる鉄繊維のフェントン反応など活性酸素の発生が重要であると考えられている。

これまでの報告としては2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group(Arch Pathol Lab Med—Vol 142, January 2018)にしたがって、中皮腫の診断マーカーについて研究が活発にすすんでいるが、病理診断に必要な中皮腫特異的な発現タンパク質(腫瘍マーカー)が、同定されておらず、肺腺癌、肉腫様癌、胸膜炎などとの鑑別に時間がかかることが課題の一つと考えられている。さらに、中皮腫の中には、肺がん病理形態学的に類似し、外胚葉性に近い表現型を示す上皮型、間葉系に形態・表現型を示す肉腫様型、それらが混在した二相型など、きわめて多様な亜型があり、診断をさらに困難にしている点は否めない。肺生検などによらず、血液マーカーなど簡便な方法で採取できる試料を用いた検査が可能になるよう、疾患特異的なマーカーの探索がのぞまれている。これまで、バイオマーカーとして遺伝子分析によりATP依存性RNAヘリカーゼ、タンパク質Xが突然変異感受性遺伝子座として報告されている。患者の末梢血に含まれる微量なバイオマーカー探索の最初として、悪性中皮腫の腫瘍細胞を含む試料としてホルマリン固定パラフィン包埋標本(formaldehyde-fixed-paraffin-embedded specimen) FFPEを用いた。その中で、これまで、薄切後FFPEを導電性スライドガラス上に搭載後、親水化表面処理により、組織表面のペプチドペプチドのイオン化効率を少なくとも4~5倍に促進することに成功した(Kakimoto et al, 2012)。さらに、顕微鏡観察下でのレーザー光によるマイクロダイセクション(LMD)によってFFPEから病変部の切除を行い、LC/MSを組み合わせる分析手法を確立した(Kakimoto et al, 2013)。加えて、クロマトグラフの定量・統計分析を工夫した。その結果、FFPEを用いた質量分析により、大腸がん、心筋梗塞、SLEなど病変特異的なタンパク質の同定に成功してきた。この工程を用いることで中皮腫組織を用いて新たな診断マーカー、分子標的創薬シーズの発見が期待できると考えた。一方、中皮腫が発症する胸膜は膠原線維が多く、可溶化しにくく分析が難しい組織の一つである。このため、中皮腫、肺組織の質量分析のため、特別な化学処理が必要と考えられた。

2. 研究の目的

この研究では、上皮性悪性胸膜中皮腫 (EMPM) および健康な中皮細胞のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルを使用してプロテオミクス分析を実行し、EMPM の病態生理学を特徴付け、新しい潜在的な診断マーカーと治療標的を確立することを目的とした。

3 . 研究の方法

サンプル

正常中皮 (NM)、悪性中皮腫、および肺腺癌、重層扁平上皮組織は、組織マイクロアレイとして得られた。93 人の悪性中皮腫患者のプロフィール、肺癌を含む参考資料(肺腺癌 64 症例、重層扁平上皮癌 69 症例、隣接腫瘍の 28 NM 組織)が含まれる。各患者について、2 つの異なる組織が分析に使用された。これらの組織の組織診断は 3 人の病理学者によって検証された。免疫組織化学もあわせて診断の再確認が行われた。

タンパク質抽出

6 つのセクションがタンパク質抽出に使用された。タンパク質は、各組織サンプルを、アセトニトリルを含む 0.1 mol/L 重炭酸アンモニウム 20 μ L に懸濁し、組織ホモジナイザー、続いて 10,000 \times g で 1 分間遠心分離し、95 $^{\circ}$ C で 180 分間加熱し、再度 10,000 \times g で 1 分間遠心分離し、氷上で冷やした。その後、トリプシンを上澄みに加え、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。質量分析のためにタンパク質を精製および濃縮し、サンプルを 95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱して乾燥させた後、サンプル (1 μ L) を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) に供した。

LC/MS

サンプルは、質量分析計 TripleTOF 5600+ を用いて、エレクトロスプレー法でイオン化、分析された。イオン化ペプチドのデータ取得は、UniProtKB/Swiss-Prot データベースを使用して分析された。ソフトウェアを使用して得られたペプチドは信頼度 95% 以上で同定された。

免疫染色

製造者のプロトコルに従って、EnVision キット (Agilent Life Technologies, Dako, Glostrup デンマーク) を使用して標本を染色した。ポドプラニン / gp36 (D2-40)、BAP1, WT1、および Calretinin が自動免疫染色装置 (Ventana BenchMark AutoStainer [Ventana Medical Systems, ツーソン, AZ]) を使用して行われたカルレチニン、D2-40, WT-1 の染色所見、BAP1-loss の免疫染色により、TMA の中皮腫の診断を確認した。

4 . 研究成果

タンパク質抽出方法の開発

導電体スライドガラスへの伸展、破碎、化学処理の有機溶剤による溶出溶液、抽出後乾燥固相化および再溶解、アミノ酸還元・アルキル化、標本表面処理などの条件の最適化を行った。これらの工程後、溶出ペプチドをトリプシンで消化し、ナノフロー逆相 LC を用いて Trap-and-elute 法により分離、エレクトロスプレーイオン源を備えた、四重極飛行時間型ハイブリッド質量分析計 (TOF-MS) を用いて分析した。実際の測定では、病理標本中の結合組織の成分比、疎水性・親水性アミノ酸残基の比率、さらには腫瘍成分比により、大きく収率が変わることがわかり、中皮腫測定条件の設定に苦労した。ビーズ式破碎装置を採用し、組織の最適破碎周波数設定などを確立した。またペプチドのアミノ酸疎水性度の平均 GRAVY score (疎水性度) を指標にもちいた。

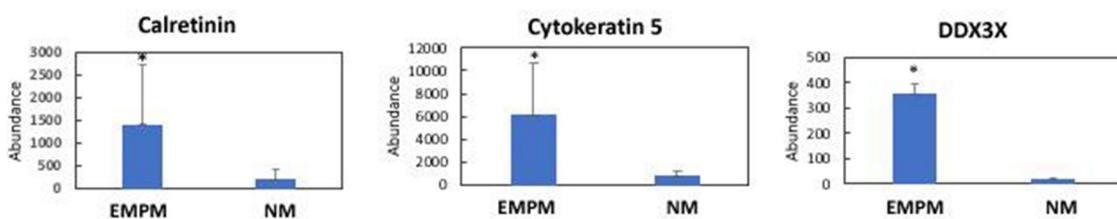
各組織サンプルを、アセトニトリルを含む 0.1 mol/L 重炭酸アンモニウム 20 μ L に懸濁し、組織ホモジナイザー、続いて 10,000 \times g で 1 分間遠心分離し、95 $^{\circ}$ C で 180 分間加熱し、

再度 10,000 × g で 1 分間遠心分離し、氷上で冷やした。質量分析のためにタンパク質を精製および濃縮した。サンプルを 95 °C で 5 分間加熱して乾燥させた後、サンプル (1 μL) を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) にかけて。

液体クロマトグラフィー質量分析によるプロファイリング

合計 877 のタンパク質が同定された。悪性中皮腫の診断に現在使用されているカルレチニンタンパク質の特定に成功した。さらに、ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ DDX3X (DEAD-Box Helicase 3 X-Linked) 12 タンパク質 X が、突然変異があると報告されている遺伝子の中で有意にアップレギュレートされていることを確認した。93 悪性中皮腫, 64 肺腺癌, 63 重層扁平上皮癌, および 3 腹部間質腫瘍の タンパク質 X の IHC が実施された。さらに、D2-40, WT113, カルレチニン, および BAP1 の IHC で、組織学的診断の検証 14, 15 および 悪性中皮腫 の組織学が確認された。IHC の結果は、陽性細胞の陽性強度と比率に基づいてスコア化された。

要約すると、悪性中皮腫の上皮型の症例の大部分は陽性であり、タンパク質 X の染色は細胞質に拡散していた。腹腔の類上皮中皮腫, 肉腫様, 二相性 悪性中皮腫, および少数の EMPM および NM は タンパク質 X に対して負または弱陽性でした。タンパク質 X の 肺腺癌 の陽性率は 5% であり、これは以前に報告されたデータと一致し、タンパク質 X の重層扁平上皮癌 は 3% であった。タンパク質 X 陽性率は、肉腫様 悪性中皮腫, 二相性腹膜 悪性中皮腫, 上皮様 悪性中皮腫, 肺腺癌, 重層扁平上皮癌, およびその他の参照組織よりも上皮型悪性中皮腫で高いことがわかった ($p < 0.01$)。これらの結果は、タンパク質 X が 上皮型悪性中皮腫のマーカーの 1 つであることを示した。



図：イオン化の量を示す Abundance の統計分析で類上皮性悪性中皮腫を分析したものである。

悪性中皮腫組織で、小胞体のカルシウム代謝と小胞体ストレスの制御に寄与する他のカルシウム結合タンパク質のレベルが大幅に増加することがわかった。たとえば、グルコース調節タンパク質、シャペロンタンパク質、エンドプラスミン、小胞体ストレス誘発性応答タンパク質が、悪性中皮腫組織で増加した。RNA 結合核細胞質シャトルタンパク質である Y は、翻訳伸長因子と関連して、核および粗面小胞体 (ER) に局在している。IHC は、症例の大部分が Y に対して陽性であることを明らかにした。Y に対する 肺腺癌 および 重層扁平上皮癌 の陽性率は、それぞれ 5% および 0% であり、Y は肉腫様 悪性中皮腫, 二相性悪性中皮腫, 腹膜上皮性 悪性中皮腫, 肺腺癌, 重層扁平上皮癌, および他の参照組織よりも 上皮型悪性中皮腫 で高かった ($p < 0.01$)。これらの結果は、Y が EMPM 診断の有用なマーカーであることを示した。

免疫染色により、Z は、胸膜または腹膜、類上皮、二相性、または肉腫に由来するかどうかにかかわらず、すべての悪性中皮腫 の細胞質で陽性であり、NM では陰性であった。

BAP1 はユビキチンカルボキシ末端加水分解酵素の一種で、悪性中皮腫細胞で頻繁に変異や欠失が起こる。ユビキチン-タンパク質リガーゼ Z が増加した。このタンパク質の枯渇は、悪性中

皮腫組織で ER ストレスを引き起こす。この結果に基づいて、EMPM 組織ではユビキチン化とプロテアソーム システムが高度に活性化されていると結論付けた。免疫染色により、Z は悪性中皮腫の サブタイプの細胞を識別できるマーカーとして利用可能であった。

総括

この研究では、MM タンパク質抽出物を使用した LC/MS によって同定された X, Y, Z が、悪性中皮腫の病因を理解するための新しいマーカーとして機能することがわかりました。X は非小細胞肺癌細胞の遊走を制御するが、中皮腫細胞における X 関連のシグナルカスケードは、アスベストの一種であるクロシドライトによって阻害される。したがって、アスベスト誘発性中皮腫腫瘍形成に X が関与するかどうかは、なお明らかではない。

Y は、細胞内カルシウム貯蔵庫として機能する ER に局在している。Y は細胞質で広範に陽性であり、ER での局在と一致している。カルシウム シグナル伝達はホメオスタシスによって厳密に制御されているため、カルレチニンと Y の増加は ER の調節不全を示す。ER のカルシウム濃度が低くなると、カルレチニンや、カルデスモンやカルメニンなどの他のカルシウム結合タンパク質の発現が増加し、ER におけるカルシウムイオン濃度。LC/MS データにおける ER 関連タンパク質の包括的な増加量は、この仮説を支持する可能性がある。したがって、カルレチニンと Y の高い IHC 染色性は、小胞体ストレスが Y の蓄積を促進することを示している可能性があると考えている一方、X と同様に、Y IHC 染色性は均一であり、D2-40 よりも組織学的マーカーとしてより有用である可能性がある。さらに、ER 内のカルシウムの減少、つまり細胞内カルシウム濃度の増加は、X 経路を活性化することが予想される。

ユビキチン化とプロテアソームに関連するタンパク質の濃度は、悪性中皮腫組織ではるかに高かった。ミスフォールド酸化タンパク質のエンドプラスミンへの結合に続いて、ER プロセッシング、最終段階でのユビキチン化、およびその後の分解が起こる可能性がある。したがって、ユビキチン化は中皮腫細胞の増殖に関与している可能性がある。プロテアソーム系のユビキチン化に関連するタンパク質の高発現は悪性中皮腫、腺癌で見られ、ボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害剤も治療に有用であることを示唆している。

同定されたプロテオミクスプロファイリングの中で、酸化ストレスは、MM の最も注目値する説得力のあるプロファイリングである。チオレドキシンの還元により、メチオニンメチルチオエーテル基が酸化されるタンパク質の数が増加する可能性がある。永井らによって報告されたように、実験モデルでは、中皮腫細胞はフェントン反応により常に ROS にさらされている可能性がある。Z は 2 分子のグルタチオンからの脱水素(またはその逆反応)を触媒する。したがって、Z の増加は、チオレドキシンの還元型の枯渇で、悪性中皮腫組織が酸化ストレスの状態にあることを示している。このストレスは、DNA に直接損傷、酸化的に修飾されたタンパク質レベルの包括的な増加を引き起こす可能性がある。

現在の研究では、FFPE の組織病理学的セクションを使用して、いくつかの疾患のバイオマーカーを特定した。サンプルサイズは限られていたが、取得したペプチド プロファイリング データは十分であり、検証には IHC で十分であった。要約すると、ストレス誘発性応答が悪性中皮腫の病因に関連している可能性があることを観察した。今後、症例数を増やし、発現したタンパク質と臨床試験データとの比較により、より有用なデータが得られることを期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hiratsuka T, Arakawa Y, Yajima Y, Kakimoto Y, Shima K, Yamazaki Y, Ikegami M, Yamamoto T, Fujiwake H, Fujimoto K, Yamada N, Tsuruyama T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hierarchical Cluster and Region of Interest Analyses Based on Mass Spectrometry Imaging of Human Brain Tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62176-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiratsuka Takuya, Arakawa Yoshiki, Yajima Yuka, Kakimoto Yu, Shima Keisuke, Yamazaki Yuzo, Ikegami Masahiro, Yamamoto Takushi, Fujiwake Hideshi, Fujimoto Koichi, Yamada Norishige, Tsuruyama Tatsuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Hierarchical Cluster and Region of Interest Analyses Based on Mass Spectrometry Imaging of Human Brain Tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62176-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yajima Y, Hiratsuka T, Kakimoto Y, Ogawa S, Shima K, Yamazaki Y, Yoshikawa K, Tamaki K, Tsuruyama T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 7493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25817-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiokawa M, Kodama Y, Sekiguchi K, Kuwada T, Tomono T, Kuriyama K, Yamazaki H, Morita T, Marui S, Sogabe Y, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Sakuma Y, Maruno T, Uza N, Tsuruyama T, Mimori T, Seno H, Chiba T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Laminin 511 is a target antigen in autoimmune pancreatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.aaq0997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitomi H, Kobayashi S, Miyagawa-Hayashino A, Okahata A, Doi K, Nishitani K, Murata K, Ito H, Tsuruyama T, Haga H, Matsuda S, Toguchida J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 3762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06187-0.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nigmat Y, Hata K, Tamaki I, Okamura Y, Tsuruyama T, Miyauchi H, Kusakabe J, Tajima T, Hirao H, Kubota T, Inamoto O, Yoshikawa J, Goto T, Tanaka H, Uemoto S.	4. 巻 103
2. 論文標題 Human Atrial Natriuretic Peptide in Cold Storage of Donation After Circulatory Death Rat Livers: An Old but New Agent for Protecting Vascular Endothelia?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 512-521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000002552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiramatsu Y, Fukuda A, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Tsuda M, Matsumoto Y, Kimura Y, Yoshioka T, Takada Y, Maruno T, Hanyu Y, Tsuruyama T, Wang Z, Akiyama H, Takaishi S, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H.	4. 巻 116
2. 論文標題 Arid1a is essential for intestinal stem cells through Sox9 regulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 1704-1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1804858116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鶴山竜昭、平塚拓也
2. 発表標題 グリオブラストーマ、転移性脳腫瘍の質量分析イメージング
3. 学会等名 臨床病理 (0047-1860)67巻補冊 Page197(2019.10)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平塚拓也、鶴山竜昭
2. 発表標題 ホルマリン固定組織を用いた質量分析イメージングによる超急性心筋梗塞領域の可視化
3. 学会等名 日本病理学会会誌(0300-9181)108巻1号 Page326(2019.04)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴山竜昭
2. 発表標題 質量分析イメージングによる心筋梗塞バイオマーカー探索
3. 学会等名 臨床検査医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsuruyama T, Hiratsuka T	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 13
3. 書名 Histology "Novel Techniques in Histologic Research: Morphometry and Mass Spectrometry Imaging"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉澤 明彦 (Yoshizawa Akihiko) (80378645)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	平塚 拓也 (Hiratsuka Takuya) (90641639)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関