

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18390049
研究課題名（和文）：薬物誘導性肝障害発症におけるマイクロ RNA の役割
研究課題名（英文）：Role of microRNA on drug-induced hepatotoxicity
研究代表者 横井 毅 (YOKOI TSUYOSHI)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：70135226

研究成果の概要

本研究は、近年急速に様々な機能が明らかになつてきたマイクロ RNA の薬物代謝および薬物誘導性肝障害における役割を明らかにすることを目的とした。本研究において、① チオアセタミド等の投与による肝障害モデルラットにおいて、miR-21 が保護作用に働くことを見出した。② 環境化学物質や薬物の毒性を高める CYP1B1 は、miR-27b が誘導および恒常的発現に関与していることを見出した。③ 臨床で使用される薬の半分以上の代謝に関与する CYP3A4 は、PXR という転写因子が miR-148a によって制御されることが CYP3A4 の活性の個体差に大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに、④ 細胞の増殖制御の役割を担っている活性型ビタミン D₃ の代謝酵素に、転写後調節に miR-125b が関わっていることを明らかにした。以上、肝障害を初めとする副作用の発現に関わる多くの代謝酵素について、マイクロ RNA の関与を明示することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：薬物代謝学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：チトクロム P450, マイクロ RNA、薬物誘導性肝障害、miR-27b、miR-148a、CYP3A4、miR-125b、miR-378

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において、候補化合物が開発中止になる主な理由は、非臨床および臨床における薬物誘導性の毒性の発現にある。特に肝障害発症の問題が頻発している。これまでに薬物誘導性の肝障害については様々な視点からのアプローチがなされて来た。申請者の研究室でも、これまでに多くの論文を報告している。しかし、この研究領域の目立った進展は

報告されていない。すなわち、DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析および2次元プロテオミクス手法による蛋白質発現の比較解析は、ヒトと実験動物間の種差の大きなギャップを解決できておらず、加えて、in vivo 実験とヘパトサイトなどを用いた in vitro の実験結果に相関性が乏しいことが明らかになってきた。こうしたことは、ヒトに於ける薬物誘導性肝毒性発現を予測する究が行き詰まる

傾向にあると考えられた。

本課題申請では、最近数年間に 400 種類を超える種類がクローニングされ、現在もその数が増え続けているヒトマイクロ RNA が、薬物誘導性肝障害および薬物代謝酵素の発現調節に及ぼす役割について検討する。薬物動態および薬物代謝の領域におけるマイクロ RNA についての研究報告は、本課題を開始する時期までには皆無であった。しかしながら、長い研究の歴史と膨大なデータが積み重ねられているチトクロム P450 の研究の世界では、例えば CYP1B1 や CYP2E1 はメッセンジャーRNA量と酵素蛋白や活性との相関が無いことが知られている。従って、転写後調節の関与、すなわちマイクロ RNA の関与を考えた。これらの分子種は、薬物の毒性化の酵素反応である「代謝的活性化」を担う酵素であるため、毒性発現に何らかの役割を果たしていると考え研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、近年急速に様々な機能が明らかにされつつあるマイクロ RNA の薬物代謝および薬物誘導性肝障害における役割を明らかにすることを目的とした。本研究において、①チオアセタミド等の典型的な肝障害性の薬や化合物を実験動物に投与し、肝マイクロ RNA の発現変動を解析することにより、肝障害性のバイオマーカーとしてのマイクロ RNA の位置づけの可能性を見出すことを目的とした。マイクロ RNA は種を超えて配列が保存されている場合が多いため、種差の影響を受け難いと考えた。②環境化学物質や薬物の毒性を高める CYP1B1 は、古くから messenger RNA の発現量が蛋白発現量と相関しないことが知られていたため、典型的な代謝的活性化酵素である CYP1B1 に検討を行った。③臨床で使用される薬の半分以上の代謝に関与する CYP3A4 は、薬の解毒のみならず、代謝的活性化にも関与していることが考えられた。CYP3A4 の個人差の原因はこれまで未解明である。よって、ヒト肝における CYP3A4 の発現の個人差をマイクロ RNA から説明することができれば、薬の副作用としての肝障害性の個人差の解明ができると考えた。さらに、④細胞の増殖制御の役割を担っている活性型

ビタミン D3 の代謝酵素である CYP24 の配列の *in silico* 解析から、転写後調節が考えられた。*In silico* 解析の有用性の検討を含めて解析を行うこととした。

3. 研究の方法

① miRNA マイクロアレイを用い、チオアセタミド処置後早期において変動する miRNA について探索した。毒性に関与する miRNA として、miR-21 が見出され、その変動は複数の肝毒性化合物において認められた。見出された miR-21 について、*in vitro* 実験系を用いて miR-21 抑制状態が及ぼす薬物誘導性細胞障害を検討した。検討に用いたシンバスタチン、ロバスタチンにおいて細胞障害性が miR-21 の As0 導入によって増強され、miR-21 の働きは細胞の保護作用であることを薬物誘導性細胞障害の面から明らかにした。

② CYP1B1 mRNAs の構造と miR-27b 認識配列について、全長 5.2 kb のヒト CYP1B1 mRNA は 3' 非翻訳領域末端 40 b 程度の領域に高い相同性が認められ、この領域が miR-27b と相補的であることを見出した。miR-27b の発現量とルシフェラーゼアッセイによる MRE27b の機能評価について、MCF-7 細胞に発現している miR-27b の機能を阻害するため miR-27b に対するアンチセンスオリゴボヌクレオチド (As0) を導入したところ、内因性の miR-27b により抑制されていた活性の回復が認められた。一方、miR-27b の発現が低い Jurkat 細胞では内因性の miR-27b による影響が認められず、precursor miR-27b の導入により MRE27b を組み込んだプラスミドにおいて顕著な活性の低下が認められた。miR-27b の阻害による内因性 CYP1B1 タンパク発現への影響について、MCF-7 細胞に内因性に発現する CYP1B1 が miR-27b により制御されているか検討した。miR-27b に対する As0 を導入したところ miR-27b の発現の低下を認め、一方で CYP1B1 タンパク発現量の増大が認められた。また、酵素活性も As0 の濃度および時間依存的に上昇することを明らかにした。③マイクロ RNA とヒト肝で最も重要な CYP3A4 個人差の関わりを検討した。反応性代謝物生成に主たる役割を果たす CYP3A4 の個人差発現の原因が解明されなければならない。本研

究ではヒト CYP3A4 の発現と誘導に関わる核内受容体である PXR が miR-148a によって制御されていることを初めて明らかにした。細胞レベルで miR-148a を強制発現させるとリファンピシンによる誘導も完全に阻害されること等を明らかにした。

④ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割の研究では、最初に、コンピューター解析によって CYP24 mRNA の 3' -UTR に miR-125b が結合する領域 (MRE125b) が見いだされた。最初に、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞および MDA-MB-435 細胞、ヒト卵巣顆粒膜細胞癌由来 KGN 細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞およびヒト胚腎由来 HEK293 細胞における CYP24 mRNA およびタンパク発現量、さらに miR-125b の発現量を調べた。その結果、CYP24 タンパク発現量と miR-125b の発現量との間に有意な逆相関関係が認められ、CYP24 は miR-125b によって転写後調節を受ける可能性が示された。次に、CYP24 の MRE125b に対して miR-125b が機能的に作用するかどうかルシフェラーゼアッセイにより検討した。ルシフェラーゼ遺伝子の下流に MRE125b を含むさまざまな領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、miR-125b 陰性の MCF-7 細胞と miR-125b 陽性の KGN 細胞に導入した。KGN 細胞では内因性の miR-125b によるルシフェラーゼ活性の低下が認められ、MCF-7 細胞では pre-miR-125b を導入することにより同様に活性の低下が認められた。さらに、内因性の miR-125b を阻害するため KGN 細胞に miR-125b に対する As0 を導入したところ、ルシフェラーゼ活性の回復が認められた。これらのことから、CYP24 の MRE125b に miR-125b が機能的に作用することが明らかになった。さらに、miR-125b が内因性の CYP24 に対しても機能することを明らかにした。MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入することで CYP24 タンパクが減少し、KGN 細胞に As0 を導入することで CYP24 タンパクが増加した。このとき CYP24 mRNA の変動はタンパクとは異なる挙動を示したことから、CYP24 は転写後調節を受けたことが示され、miR-125b は内因性の CYP24 の発現調節に関与することが明らかになった。

4. 研究成果

①肝障害化合物投与によるマイクロ RNA の発現変動とその役割の検討、

肝における miRNA として、miR-122a が最も多く存在しており、様々な検討がなされているものの、薬物誘導性肝障害との関与はこれまでに報告されておらず、miRNA による肝毒性への関与についての研究は進んでいないのが現状である。本研究では、miRNA においても応用されているマイクロアレイ技術を用いて、チオアセタミド (TA) 処置後の網羅的な miRNA 発現変動の解析を行った。今回用いたラットにおける過去の報告はないために完全な比較を行うことは難しいが、確認できた一部の miRNA については発現パターンが似通っているものも、そうでないものも存在していた。実験条件として、TA 投与直後よりかなり早い段階における変動について検討を行った。miRNA による転写調節は、転写された primary miRNA から mature miRNA になるとすぐにその作用を発揮すると考えられるためである。今回変動が認められた miRNA は増加が 10 種、減少が 14 種であったが、ラットにおいて同一クラスターに属するものは存在しなかった。miR-21 について、5 種類の化合物においてその発現変動パターンを検討した。その結果、肝障害の発症時間に相関し、毒性発症が早い APAP および四塩化炭素において投与後 1 時間において発現の増加が認められ、逆にそれ以外の比較的毒性発現が遅い化合物においては早い段階での抑制が認められた。次に、miR-21 の抑制状態における細胞障害性の影響について検討を行った。しかし、本研究における検討に用いた HeLa 細胞において、TA 処置による細胞毒性を引き起こすことができなかった。肝由来ではない上に、薬物代謝能が低下している培養系において毒性を引き起こすために必要な TA の濃度が非常に高くなってしまい、生存率の測定系にも影響が出たためである。それに加えて、miR-21 の標的蛋白質を複数の予測サイトによる検討の結果、PPAR- α を本検討における標的蛋白質として設定した。そこで、PPAR- α のアゴニストとして知られるフィブラート系薬剤との併用で、横紋筋融解症を引き起こすことが知られるスタチン系薬剤に

ついて検討した。脂溶性のシンバスタチン、ロバスタチンと、対照薬として水溶性のプラバスタチン、フルバスタチンについて検討を行ったところ、脂溶性スタチンにおいてのみ濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。前述の通り、miR-21 は現在急速に研究が進められている miRNA であるが、薬物誘導性細胞障害との関係を明らかにした報告は初めてである。以上の結果から、見出された miR-21 の誘導は、薬物誘導性細胞障害に対して保護的な作用を示すことが示唆された。しかしながら、細胞障害に対する保護作用を示したと考えられる、HeLa 細胞における miR-21 の具体的な標的となる遺伝子を見出すには至らなかった。今後の検討課題として、*in vivo*における As0 の導入もしくは安定発現系を用い、生体内における miR-21 の抑制による薬物誘導性肝障害への影響の検討が考えられる。

②本研究により CYP1B1 の発現には転写調節に加えて、miR-27b による転写後調節も関与することが明らかとなった。miR-27b は乳腺において高く発現している。miR-27b の発現を制御する因子は明らかにされていないが、いくつかの miRNA の発現は腫瘍の発達とともに変化することが知られている。CYP1B1 は腫瘍組織において高い発現が認められていることから、miR-27b の発現の低下が関与していることが示唆される。検討に用いた乳癌組織はすべて ER 陽性かつ progesterone receptor 陽性であった。また miR-27b および CYP1B1 の発現量と病理学的特徴、病期およびリンパ節転位との関連は認められなかった。乳癌において過剰発現した CYP1B1 は 17 β -エストラジオールの代謝を上昇させることが考えられる。17 β -エストラジオールはエストロゲン依存的な腫瘍の発達を促進する一方で、CYP1B1 により生成する代謝物である 4-水酸化エストラジオールは DNA 損傷を引き起こすことから、ホルモンが関与する毒性に関与することが示唆された。

③PXR は薬物代謝や薬の排泄に関わる 40 以上の蛋白の発現の制御に関わっている。PXR の制御機構の研究は、薬物の pharmacokinetics

の個人内および個人間変動の理解には重要な情報になると考えられる。多くの報告がヒト肝試料における PXR mRNA の変動について報告しているが、そのタンパク質レベルでの発現量との相関については明らかにしていない。この研究で最初に我々は、PXR の mRNA とタンパク質の発現量が相関しないことを見出した。このことは、マイクロ RNA の関与の可能性を示唆するものである。ルシフェラーゼアッセイにより内因性および外因性の miR-148a を発現させることにより PXR の miR-148a 認識配列 (PXRMR148) が機能していることを明らかにした。さらに内因性の PXR タンパク質は miR-148a を過剰発現させることにより消失し、阻害することにより誘導されることを示した。これにより、ヒト PXR は転写後調節を受けていることが明らかになった。さらに、LS180 細胞を用いて、CYP3A4 の誘導が miR-148a に依存した PXR の変動によって制御されていることを見出した。興味あることに miR-148a が認識すると考えられる配列が CYP3A4 mRNA の下流に存在する。結合エネルギー計算では CYP3A4 が PXR よりも優位と思われた。しかし、この配列は全く機能していないことをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。よって、CYP3A4 は miR-148a によって直接制御される可能性は無いと考えられた。ヒト肝パネルで miR-148a は PXR 蛋白質の発現量と反比例していた。このことは miR-148a が PXR に機能していることを示唆していた。一方、CYP3A4 は mRNA レベルと蛋白質レベルの発現量は相関していたことは、過去の多くの報告を支持するものであった。ヒト肝において、PXR 蛋白質量は CYP3A4 mRNA 発現量と相関していたことは、miR-148a が PXR を介して CYP3A4 の発現に影響をしていることを示す。一方、ヒト MDR 1 および CYP2B6 の発現に miR-148a は影響をしていなかった。さらに CYP3A4 mRNA は HNF4 α や CAR の蛋白発現量とも相関していなかった。ヒトと齧歯類を比較すると、PXR の ligand-binding domain はかなり保存されているために、種差の大きな影響はないと予想される。さらに、ほとんどのマイクロ RNA は進化論的にもかなり保存されていることも知られており、種差の影響が少ないと予想さ

れる。実際 miR-148a の結合配列は、ヒトとラットで1塩基の差である。よって、ラットPXRもmiR-148aで制御されることが予想される。本研究において、ヒトPXRはmiR-148aによって転写後調節を受け、ヒト肝におけるCYP3A4の発現量に影響を及ぼしている。この発見は、ヒトCYP3A4の大きな個人差の説明の糸口になると考えられる。

④ヒトCYP24の発現調節におけるmicroRNAの役割の研究。CYP24 mRNAのMRE125bはmiR-125bに対して全体的な相補性は低いものの、seed sequenceが完全に相補的である。このため、miR-125bがCYP24のMRE125bを標的として認識し、ルシフェラーゼ活性の変動が認められたと考えられる。pGL3/UTR2において大きな活性の低下が認められたため、miR-125bはCYP24 mRNA全長に対しても機能的に働くことが示唆された。本研究においても25(OH)D₃を基質とした場合、CYP27B1の代謝物である1 α , 25(OH)₂D₃の生成は認められず(Fig. 11: retention time 45.0 min)これらの報告と一致した。このことから、MCF-7細胞においては25(OH)D₃から1 α , 25(OH)₂D₃への経路を考える必要がなく、CYP24活性を評価できたと考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

- ① Takuya Mohri, Miki Nakajima, Shingo Takagi and Tsuyoshi Yokoi; MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer, in press*. 査読有
- ② Katsuhiko Mizuno, Miki Katoh, Hirotoshi Okumura, Nao Nakagawa, Toru Negishi, Takanori Hashizume, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation of benzodiazepine by CYP3A4. *Drug Metab. Dispos., 37: 345-351 (2009)*. 査読有
- ③ Keiichi Minami, Miki Nakajima, Yuto Fujiki, Miki Katoh, Frank J. Gonzalez, and Tsuyoshi Yokoi. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and lipoprotein lipase by aryl hydrocarbon receptor. *J. Tox. Sci., 33: 405-413 (2008)*. 査読有
- ④ Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya

Mohri, and Tsuyoshi Yokoi: Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by microRNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem., 283: 9674-9680 (2008)*. 査読有

⑤ Tatsuki Fukami, Miki Katoh, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima; Human cytochrome P450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants: naphthalene, styrene, and toluene. *Chem. Res. Toxicol., 21: 720-725 (2008)*. 査読有

Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Miki Katoh and Tsuyoshi Yokoi; Glucuronidation of thyroxine in human liver, jejunum, and kidney microsomes. *Drug Metab. Dispos., 35: 1642-1648 (2007)*. 査読有

Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Koichi Tsuneyama, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi; Knockdown of γ -glutamylsysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem., 282: 23996-24003 (2007)*. 査読有

Hirotoshi Okumura, Miki Katoh, Keiichi Minami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi: Change of drug excretory pathway by CCl₄-induced liver dysfunction in rat. *Biochem. Pharmacol., 74: 488-495 (2007)* 査読有

Masahiro Ito, Miki Nakajima, Eriko Higashi, Rhoko Yoshida, Kiyoshi Nagata, Yasushi Yamazoe, and Tsuyoshi Yokoi: Induction of human CYP2A6 is mediated by the pregnane X receptor with peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α . *J. Pharmacol. Exp. Ther., 319: 693-702 (2006)* 査読有

Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi: MicroRNA regulates the expression of human CYP1B1. *Cancer Res., 66: 9090-9098 (2006)* 査読有

Rawiwan Maniratanachote, Keiichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi: Dephosphorylation of ribosomal P0 protein in response to troglitazone-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett., 166: 189-199 (2006)*. 査読有

Miki Katoh, Naoto Suzuyama, Toshiyuki Takeuchi, Sumie Yoshitomi, Satoru Asahi and Tsuyoshi Yokoi: Kinetic analyses for species differences in P-glycoprotein-mediated drug

transport. *J. Pharm. Sci.*, **95**: 2673-2683 (2006). 査読有

Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Miki Katoh, Wenchao Zheng, Colin R Jefcoate, and Tsuyoshi Yokoi: Binding of steroidogenic factor-1 to the regulatory region might not be critical for transcriptional regulation of human *CYP1B1* gene. *J. Biochem.*, **139**: 527-534 (2006). 査読有

Keiichi Minami, Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi: Gene expression analyses for hepatotoxicity in thioacetamide administered rat by DNA microarrays. *Mut. Res.*, **603**: 64-73 (2006). 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

① 茂利拓也、中島美紀、高木信伍、横井 毅、microRNA によるヒト VDR の発現制御、第 23 回日本薬物動態学会年会、10.30-11.1、熊本 (2008)

② 中島美紀、高木信伍、駒形小夜香、茂利拓也、土屋祐樹、横井 毅、薬物代謝酵素と核内レセプターの microRNA による発現調節、第 23 回日本薬物動態学会年会、シンポジウム、10.30-11.1、熊本 (2008)

③ Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. CYP enzymes and cancer: regulation by steroids and miRNA. 9th Advanced Course on "Steroid Enzymes and Cancer". 2008.5. 3-8. Erice, Italy.

④ Tsuyoshi Yokoi, Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Miki Katoh, Takao Taniya, and Miki Nakajima. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 15th International Conference on cytochrome P450. June 17-21, 2007, Bled, Slovenia.

⑤ Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and drug induced hepatotoxicity—the troglitazone case-. 第 21 回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 シンポジウム 東京

⑥ Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 第 21 回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 シンポジウム 東京

⑦ 奥村浩敏、加藤美紀、南 圭一、中島美紀、横井 毅：薬物排泄に及ぼす肝障害の影響、日本薬学会北陸支部会 2006.7.8 金沢

⑧ 高木信吾、土屋佑樹、中島美紀、加藤美紀、谷屋隆雄、横井 毅：ヒト *CYP1B1* 遺伝子の発現は microRNA により制御される、日本薬学会北陸支部会 2006.7.8 金沢

⑨ Keiichi Minami, Miki Nakajima, Yuto Fujiki, Miki Katoh, Frank J. Gonzalez and Tsuyoshi Yokoi. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and lipoprotein lipase via aryl hydrocarbon receptor. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6-18-23, Kyoto, Japan

⑩ Yuki Tsuchiya, Shingo Takagi, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. Human cytochrome P450 CYP1B1 is a target of microRNA, miR-27b. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6-18-23, Kyoto, Japan

⑪ Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Ribosomal protein P0 dephosphorylation associated with troglitazone-induced cytotoxicity. The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5.25-27, Jeju, Korea

〔図書〕(計 2 件)

① Tsuyoshi Yokoi : Troglitazone. J. Uetrecht Ed. In Mechanism of Adverse Drug Reaction, Handbook of Experimental Pharmacology, Springer, in press

② Rawiwan Maniratanachote, and Tsuyoshi Yokoi : A mechanistic view of troglitazone hepatotoxicity. S.C. Sahu Ed. In Hepatotoxicity: From Genomics to in vitro and in vivo. John Wiley & Sons, Ltd. pp299-311. 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 毅 (YOKOI TSUYOSHI)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：70135226

(2) 研究分担者

加藤 美紀 (KATOH MIKI)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号：70345594
(平成 19 年度末に大学を移動したため、平成 20 年度は分担者ではない。)