

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06814

研究課題名(和文)ゼノパスにおける部位特異的遺伝子組換え技術に資する遺伝子座の同定

研究課題名(英文)The identification of the gene locus applicable to gene recombination technology in Xenopus

研究代表者

北田 容章 (KITADA, Masaaki)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80324614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高い再生能を有する両生類の再生系において細胞運命追跡を可能とすべく、時空間特異的遺伝子組換え技術の検証を行った。XeXプロモーター(ゼノパスEF-1 $\alpha$ プロモーター)を利用したベクターとI-SceI発現ベクターを用い、導入遺伝子の恒常発現ゼノパス腎上皮由来A6細胞株を得た。Flpe/Flpo発現ベクターを用いて遺伝子組換えを試みたが、期待した表現系は確認されなかった。一方で、イベリアトゲイモリ個体を用いて実験を行った結果、Cre/loxPシステムおよびERT2システムの応用により、再生環境下における効果的な時空間特異的遺伝子組換えが可能である所見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類と比較し高い再生能を有する両生類は、その自発的再生機構を明らかとすることで、その自発的再生機構の将来的なヒトへの応用研究が可能となるものと考えられる。損傷後に幹細胞から必要な細胞が新たに作られることで組織再生が可能となるが、この組織再生機構の詳細な検討には細胞系譜追跡実験が必要となる。細胞系譜追跡実験において用いられる実験手法として時空間特異的遺伝子組換え技術が応用されるが、両生類においては時空間特異的遺伝子組換え技術として有効とされるシステムが確立されていなかった。本研究により、再生環境下における実質的な時空間特異的遺伝子組換え技術の確立が可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the combination of a vector utilizing the XeX promoter (Xenopus EF-1 $\alpha$  promoter) and an I-SceI expression vector to obtain the Xenopus renal epithelium-derived A6 cell line, which is constantly expressing the transgene. We attempted to recombine the transgene by the transfection of the Flpe/Flpo expression vectors, but the expected phenotype was not confirmed. On the other hand, experiments with Iberian ribbed newts showed the evidence that effective gene recombination in a regenerative environment was possible by applying the Cre/loxP system and the ERT2 system.

研究分野：組織学・再生医学・再生生物学

キーワード：遺伝子組換え 両生類 組織再生 蛍光蛋白質 細胞運命追跡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

両生類は高い再生能を有しており、その自発的再生メカニズムを解明することはこれからの再生医学発展に大きく寄与するものと考えられる。哺乳類を用いた組織発生・再生研究では細胞系譜追跡実験によりどの細胞がどの細胞へと分化するかを同定しその細胞内シグナルに迫るのが常套手段であり、ここでは Cre/loxP システム等の部位特異的遺伝子組換え技術が適用される。すなわち、特定細胞のゲノム DNA のみに導入遺伝子の組換えを生じさせることで、特定細胞だけに特定遺伝子を発現させるといった手法である。ここでは、1 染色体内に導入遺伝子 1 コピーのみが存在することが望ましく、一般に、ゲノム DNA 上にただ 1 つ存在しほとんどの細胞において活性があるセーフ・ハーバー遺伝子座と呼ばれる座位に遺伝子をロックインすることでこれを可能としている。ところが両生類ではこのセーフ・ハーバー遺伝子座が同定されていないため、部位特異的遺伝子組換え技術の適用が難しいことから、細胞系譜追跡実験を行うことが困難となっており、これにより細胞レベルでの再生メカニズム研究の発展が大きく阻まれている。また、両生類個体における時空間特異的遺伝子組換えにおいては、両生類の成育環境も問題となる。すなわち、通常用いられる時空間特異的遺伝子組換えに用いられる Cre/loxP システムはその最適温度が 37 度との報告があり、これに ERTM/ERT2 あるいは PRT2 システムを応用したシステムが両生類において実践的に活用可能であるかどうか、検証を行う必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、両生類の一種であるゼノパスにおいて安定した細胞系譜追跡実験を可能とするためのプラットフォーム開発にある。報告者はマウスやラットを用いた再生研究に長く従事してきたが、哺乳類では一般的である細胞系譜という視点で両生類の再生メカニズムを検討した研究は、実際にはかなり限られている。細胞系譜追跡実験という両生類では適用が困難であった手法を汎用化するための基盤情報を特定し、その再生メカニズム研究の推進を図ることを真の目的としている点が本研究の独自性であり、本研究の成果により両生類の自発的再生メカニズムの細胞レベルでのより精緻な研究の創造が大いに期待される。

これらのことから、以下のことを目的として研究を行った。

2a. 両生類において実際の部位特異的遺伝子組換えを可能とする遺伝子挿入部位の同定

2b. 両生類における安定的な部位特異的遺伝子組換え tg 動物作出に資するシステムの構築  
本研究では、両生類としてゼノパスおよびイベリアトゲイモリを使用した。

### 3. 研究の方法

3a. ゼノパス腎上皮由来 A6 細胞を用いた遺伝子組換えシステムと入遺伝子挿入部位の同定

3a1. 導入遺伝子の作成

CMV プロモーター、CAG プロモーター、およびゼノパス EF-1 プロモーターである XeX 遺伝子 (XeX プロモーターと表記) の制御下に赤蛍光蛋白質 mKate2 を発現し、Cre/Flp 両リコンビナーゼのいずれかの存在下にてパルミトイル酸残基修飾の緑蛍光蛋白質 EGFP (paIEGFP) (+ウシ成長ホルモン polyA 配列) を発現する pBS-1S-1srA-1srA-CMV-loxP-FRT-mKate2-STOP-loxP-FRT-paIEGFP-bGHPA-ArsI-ArsI、pBS-1S-1srA-1srA-CAG-loxP-FRT-mKate2-STOP-loxP-FRT-paIEGFP-bGHPA-ArsI-ArsI、および pBS-1S-1srA-1srA-XeX-loxP-FRT-mKate2-STOP-loxP-FRT-paIEGFP-bGHPA-ArsI-ArsI を構築する。なお、mKate2 の直後には SV40 ウイルス由来 polyA 配列を 3 つ分配置することで、paIEGFP 遺伝子のリーク発現を防ぐ (paIEGFP 遺伝子を将来的に自殺遺伝子に変更することを想定しているため)。また、上記コンストラクトは両サイドに I-SceI 認識配列を配しており、I-SceI 存在下にてインサートとして機能する。更に、その内側にはウニ ArsI プロモーターを 5' と 3' に逆向きに 2 つずつ配置させることでインスレータとして機能させ (Akasaka et al. Cell Mol Biol (1999)) 導入遺伝子の挿入部位近傍遺伝子の影響をなるべく排除する。

3a2. I-SceI 発現ベクターの作成

CAG プロモーター下に I-SceI 遺伝子と Puromycin 耐性遺伝子を発現する pCAGGS-I-SceI-Pur を作成する。I-SceI 遺伝子と Puromycin 耐性遺伝子の間は 2A リンカーにて接続し、両遺伝子からのタンパク発現を可能とする。

3a3. Cre/Flp リコンビナーゼ発現ベクターの作成

CAG プロモーター下に Cre リコンビナーゼ (pCAG-Cre) あるいは Flp リコンビナーゼ (pCAG-Flp) を発現するベクターを構築する。

3a4. 恒久的遺伝子発現を認める細胞株の樹立

ゼノパス腎上皮細胞株である A6 細胞に / / をトランスフェクションし、mKate2 の発現効率を検証する。発現効率の高いベクターに加え、の計 2 種ずつのプラスミドを用いて遺伝子導入を行う (発現効率に大きな違いがなければ、を用いる)。A6 細胞は CO2 インキュベータにて 25°C、3% CO2 下にて維持する。Puromycin により I-SceI 発現細胞を選択する。恒久的に paIEGFP を発現する細胞を FACS (Beckton Dickinson SORP FACS Area 2) を用いて選別した後、限界希釈法にてクローニングする。この細胞を培養し、Cre リコンビナーゼまたは Flp リコンビナーゼ発

現レンチウイルスを用い、部位特異的遺伝子組換えの生じた(赤蛍光に代わり緑蛍光のみを発現する)細胞株を同定し、その細胞株を得る。

### 3a5. 遺伝子導入細胞株を用いた部位特異的遺伝子組換え効率の検討

3a4 実験にて樹立した細胞株について、あるいはの遺伝子組換え酵素発現ベクターをトランスフェクションすることで Cre リコンビナーゼあるいは Flp リコンビナーゼを一過性発現させ、部位特異的遺伝子組換えの程度を検定する。FACS を用いて組換え効率の検定を行う。本研究では、将来的に細胞系譜追跡実験を行う上で実際的に有用な情報を与えるため、蛍光蛋白質の蛍光強度の変化測定が重要となる。

### 3a6. 導入遺伝子挿入部位の同定

Petek らの報告によれば (Mol Ther (2010))、遺伝子挿入部位はオフ・ターゲット認識配列の前後 2,000bp 以内、すなわち 4,000bp の範囲に収まる。これを少し超えた内向き (5'側は 5' 3' 方向、3'側は 3' 5' 方向) の 2 種類のプライマーと、導入遺伝子内の外向き (5'側は 3' 5' 方向、3'側は 5' 3' 方向) の 2 種類のプライマーを設計する。これらを 4 種のプライマーを用いてゲノム PCR を行う。実際には先に述べたアフリカツメガエルのオフ・ターゲット認識配列である 16 遺伝子座全てについて、この作業を行う。必要に応じ、更に 35 遺伝子座まで検索対象を広げる。但し、I-SceI のオフ・ターゲット切断配列はこれまで知られているものだけでも最大で 21 パターンが想定されるため、遺伝子挿入部位の同定が困難な個体が生じるおそれがある。この場合は、個体数が少なければ次世代シーケンサによる全ゲノム配列解析により、個体数が多ければゲノム SELEX 法を応用し(ゲノム DNA のフラグメンテーション、ベクターへのライゲーション、インバース PCR、シーケンシング)、導入遺伝子挿入部位を同定する。

### 3b. 両生類個体を用いた遺伝子組換え実験

#### 3b1. 導入遺伝子の作成

神経細胞特異的に活性を示す Neural tubulin プロモーター制御下に赤蛍光蛋白質 mKate2 を発現し、Cre/Flp 両リコンビナーゼのいずれかの存在下にてパルミトイル酸残基修飾の緑蛍光蛋白質 EGFP(paIEGFP)(+ウシ成長ホルモン polyA 配列)を発現する pBS-1S-IsrA-IsrA-NBT-loxP-FRT-mKate2-STOP-loxP-FRT-paIEGFP-bGhpa-ArsI-ArsI を構築する。また、上衣細胞特異的あるいは選択的に活性を示す FoxJ1 プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼあるいは Flp リコンビナーゼを発現する遺伝子組換え酵素発現ベクターとして、時空間特異的遺伝子発現を可能とするため、遺伝子組換え酵素の上流・下流に ERT2 を連結した pFoxJ1-ERT2-Cre-ERT2 あるいは pFoxJ1-ERT2-Flp-ERT2 を作成する。

#### 3b2. 両生類胚への I-SceI 法を用いた遺伝子導入と部位特異的遺伝子組換えによる個体選別

両生類胚への I-SceI 法を用いた遺伝子導入を行う。遺伝子導入には、 / / のいずれかのプラスミドを用いる。mKate2 による赤蛍光が全身に発現している(実際には左右ほぼどちらか半分に発現している)個体のみを選別し、実験に用いる。

Cre/Flp リコンビナーゼ mRNA を両生類幼生の尾に注入し(Werdien et al. Nucleic Acids Res (2001)や Ryffel et al. Nucleic Acids Res (2003)を参考とする)部位特異的遺伝子組換えの結果 mKate2 による赤蛍光から paIEGFP による緑蛍光への発現変化が生じることを確認する。この現象が確認された個体については、尾の一部を切断しゲノム DNA を得る。変化が生じない個体や、赤・緑両方の蛍光を呈する個体は選択から外す。

#### 3b2. 両生類個体の維持と定期的な遺伝子発現の確認

全身性に mKate2 を発現する両生類個体を性成熟するまで 1 匹ずつ別々に維持する (F0、1 年程度を要する)。全身性の mKate2 発現確認を定期的に行い、遺伝子発現が保たれている個体のみを維持する。

#### 3b3. 両生類個体における遺伝子組換え効率の検証

両生類個体は当初はゼノパスを想定

## 4. 研究成果

### 4a. ゼノパス腎上皮由来 A6 細胞を用いた遺伝子組換えシステムと入遺伝子挿入部位の同定

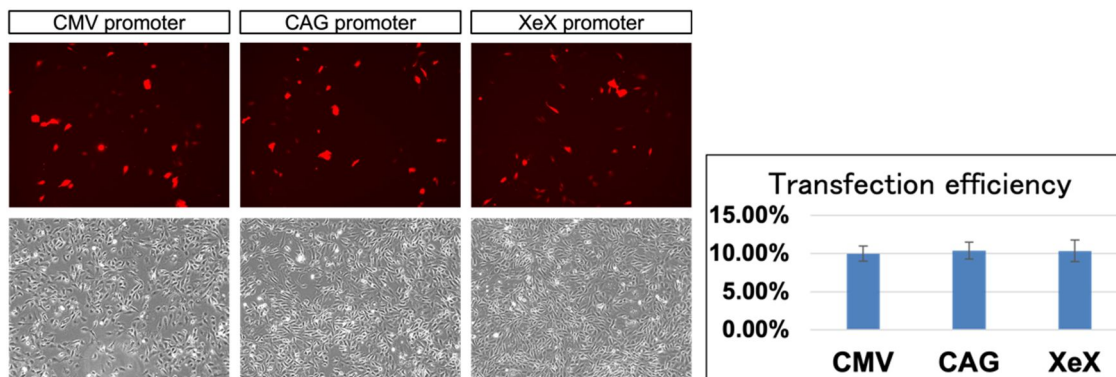


図 1 ゼノパス腎上皮由来 A6 における mKate2 の発現効率

A6 細胞へのトランスフェクションの結果、CMV・CAG・XeX のいずれのプロモーターを用いても発現効率に統計学的な有意差は観察されなかったため（図 1）以降の実験では pBS-*I*sra-*I*sra-XeX-*loxP*-FRT-*mKate2*-STOP-*loxP*-FRT-*palEGFP*-bGHPA-ArsI-ArsI を用いることとした。

と pCAGGS-*I*SceI-Pur を用いて導入遺伝子恒常発現細胞株を得た。*mKate2* 発現細胞がかなり少なかった（0.36%程度）ため、FACS によるソーティングを行い *mKate2* 恒常発現細胞を濃縮した上、クローニングにより *mKate2* 恒常発現細胞株を得た（図 2）。

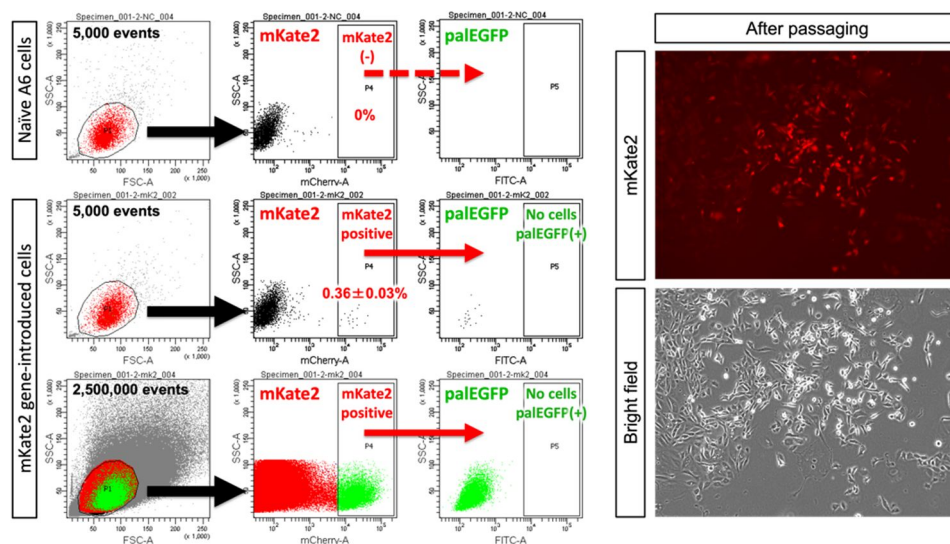


図 2 導入遺伝子恒常発現細胞株の樹立

pCAG-Flp として Flp 発現プラスミドを作成したが、Flp リコンビナーゼについては、一般にいくつかの改良版が用いられている。本研究では、温度安定型 Flp リコンビナーゼである Flpe (Rodriguez *al.* Nat Genet (2000)) およびコドン最適化 Flp である Flpo (Raymond and Soriano PLoS One (2007)) を用いて検証を行った。Flpe および Flpo の両方リコンビナーゼとも、組換えによる EGFP 発現は観察されなかった。

として Cre リコンビナーゼを用いた検証を行う前後にて研究代表者が東北大学より関西医科大学に異動することとなったが、異動に伴い導入遺伝子恒常発現細胞株が遺失してしまい、Cre リコンビナーゼについて検証を行うことができなくなってしまった。また、その後予定していた導入遺伝子挿入部位の同定に資する研究の継続が困難となってしまった。

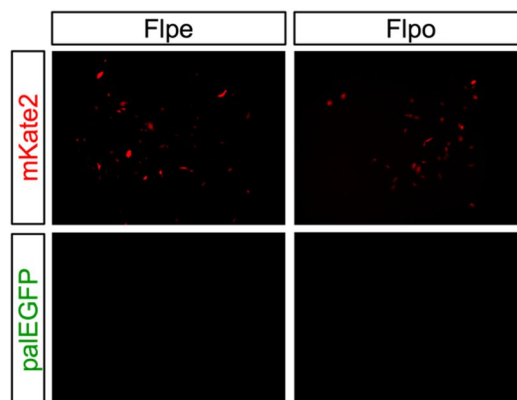


図 3 Flp リコンビナーゼによる遺伝子組換え

#### 4b. 両生類個体を用いた遺伝子組換え実験

上記研究で用いた細胞はゼノパス由来であり、ゼノパス(ツメガエル)は無尾両生類だが、無尾両生類よりも高い再生能を有することが知られている有尾両生類としてイベリアトゲイモリが知られている。これまでイベリアトゲイモリは示適飼育環境に関する知識不足や遺伝子情報等に不備があり研究環境が整備されていなかったが、広島大学・林利憲教授が中心となって本邦において構築されたイベリアトゲイモリ研究コンソーシアムおよびナショナルバイオリソースプロジェクトのご尽力の下、イベリアトゲイモリを用いた研究環境が急速に整備されてきた。これを受け、上記の通り研究代表者は本研究期間中に関西医科大学に異動したが、異動先では両生類としてイベリアトゲイモリをメインに取扱うこととなった。これに伴い、本研究で用いる両生類としてイベリアトゲイモリを用いることとした。

、 、 ベクターを用い、トランスジェニックイモリを作成し、F0 を得た後、F1 イモリを作成し、その後、 および ( ) および ( ) のダブルトランスジェニックイモリを得た。生後 5 ヶ月齢の ダブルトランスジェニックイモリの腹腔内に 4-OH タモキシフェンを投与した後、脊髄完全切断を行った。1 ヶ月後に組織を採取し、遺伝子組換えを確認した。タモキシフェン投与前より神経細胞

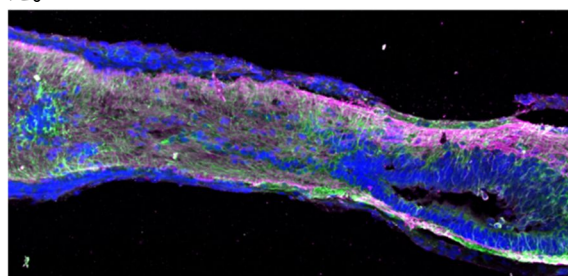


図 4 時空間特異的遺伝子組換えによる遺伝子発現として存在した細胞は赤、タモキシフェン投与により幹細胞活性のある細胞において遺伝子組

換えが生じ、その幹細胞活性のある細胞から新たに生じた神経細胞は EGFP を発現していた (図 4)。これにより、Cre/loxP・ERT2 システムが損傷後の再生実験において実践的に応用可能であることが明らかとなった。なお、 の系については、現在検証を行っているところである。

Cre/loxP システムは哺乳類において広く適用されており、その知見の幅広さから Cre/loxP システムは他の遺伝子組換え系に比し優位性があるものと考えられる。一方で Cre リコンビナーゼは酵素としての最適温度が 37 であることから (Buchholz et al. Nucleic Acids Res (1996))、一般的に 25 等の低温環境下にて飼育される両生類においては Cre/loxP システムの実践的利用可能性の検証が必要であった。Flp/FRT システムについての in vivo における有効性の検証を待つ必要はあるものの、本研究において Cre/loxP・ERT2 システムが両生類の組織再生実験系においても十分に実践的に利用可能であることが明らかとなったことから、今後、両生類を用いた再生実験における細胞運命追跡に Cre/loxP システムが幅広く用いられることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 22件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Seki-Omura R, Hayashi S, Oe S, Koike T, Nakano Y, Hirahara Y, Tanaka S, Kitada M	4. 巻 64(9)
2. 論文標題 Establishment of neural stem cell culture from the central nervous system of the Iberian ribbed newt <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 494-500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12820	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 Otsuka-Yamaguchi R, Kitada M, Kuroda Y, Kushida Y, Wakao S, Dezawa M.	4. 巻 53
2. 論文標題 Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in <i>Xenopus laevis</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 102341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102341.	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 Kitada M, Wakao S, Dezawa M	4. 巻 60(6)
2. 論文標題 Intracellular signaling similarity reveals neural stem cell-like properties of ependymal cells in the adult rat spinal cord.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 326-340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12546.	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 Kitada M, Dezawa M	4. 巻 8
2. 論文標題 Congress report: A report of the 16th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.01.001.	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 Kitada M, Murakami T, Wakao S, Li G, Dezawa M	4. 巻 67(5)
2. 論文標題 Direct conversion of adult human skin fibroblasts into functional Schwann cells that achieve robust recovery of the severed peripheral nerve in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 950-966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23582.	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31件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林真一, 関亮平, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 伊藤健, 安河内彦輝, 日笠幸一郎, 北田容章
2. 発表標題 マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入へ向けて
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関亮平, 林真一, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 平原幸恵, 田中進, 北田容章
2. 発表標題 イモリ中枢神経系に由来する幹細胞の培養法の確立
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関亮平, 林真一, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 平原幸恵, 田中進, 北田容章
2. 発表標題 イベリアトゲイモリの神経幹細胞培養法の確立
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林真一, 関亮平, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 伊藤健, 安河内彦輝, 日笠幸一郎, 北田容章
2. 発表標題 マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入へ向けて
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関亮平, 林真一, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 平原幸恵, 田中進, 北田容章
2. 発表標題 イペリアトゲイモリ中枢神経系由来の神経幹細胞の培養法
3. 学会等名 両生類研究センターバイオリソース棟落成記念シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関亮平, 林真一, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 伊藤健, 安河内彦輝, 日笠幸一郎, 北田容章
2. 発表標題 マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入へ向けて
3. 学会等名 両生類研究センターバイオリソース棟落成記念シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関亮平, 林真一, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 平原幸恵, 田中進, 北田容章
2. 発表標題 イペリアトゲイモリの神経幹細胞 ~ 脊髄の完全再生を担う細胞の分化多能性解明を目指して ~
3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 林真一, 関亮平, 大江総一, 小池太郎, 平原幸恵, 田中進, 伊藤健, 安河内彦輝, 日笠幸一郎, 北田容章
2. 発表標題 イモリ脊髄再生におけるトランスクリプトーム解析 -イモリから学ぶ再生原理-
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林真一, 関亮平, 大江総一, 小池太郎, 中野洋輔, 平原幸恵, 田中進, 伊藤健, 安河内彦輝, 日笠幸一郎, 北田容章
2. 発表標題 イモリ脊髄再生におけるトランスクリプトーム解析 -イモリから学ぶ再生原理-
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口理奈, 北田容章, 黒田康勝, 串田良祐, 若尾昌平, 出澤真理
2. 発表標題 アフリカツメガエル骨髄由来間葉系幹細胞の培養系の確立
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北田容章、村上徹、山内正憲
2. 発表標題 遺伝子導入を必要としないヒト線維芽細胞からの機能的シュワン細胞誘導
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北田容章、村上徹、山内正憲、出澤真理
2. 発表標題 ヒト線維芽細胞を用いた機能的シュワン細胞の非遺伝子導入的ダイレクトリプログラミング
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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

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