

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07858

研究課題名(和文)重症不整脈を引き起こす心Naチャンネル変異における新生児型バリエーションの影響

研究課題名(英文) Influence of neonatal variants in cardiac Na channel mutations causing severe arrhythmias

研究代表者

古谷 喜幸 (Furutani, Yoshiyuki)

東京女子医科大学・医学部・研究生

研究者番号：10424673

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)：Nav1.5 R1623Q変異を伴う胎児・新生児重症不整脈における新生児型バリエーションの寄与について、恒常発現細胞を用いたパッチクランプ実験を行った。本変異は、速い不活性化を妨げ持続Na電流を増やしてLQT3に寄与し、新生児型バリエーションはピークNa電流を低下させた。新生児型バリエーションに本変異が存在すると、速い不活性化を妨げ持続Na電流をより増加させた。本変異による胎児・新生児期LQT3の増悪は、本来成人より低いNa電流を、本変異が相対的に増大させることによるのではないかと考えられた。本変異をもつ2症例のiPS-心筋細胞を用いた研究では、疾患群のQT延長とHERG阻害剤に対する脆弱性を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、遺伝子変異を導入したNav1.5チャンネル恒常発現株の樹立法、さらにオートパッチクランプを用いた電気生理学的機能評価系を作製できたこと、不死化B細胞ライブラリーから疾患iPS細胞を作製、心筋分化、機能解析の道筋を開拓できたことである。

本研究の社会的意義は、本研究で構築した先天性心Naチャンネル疾患のモデル実験系を用いて重篤な先天性チャンネル疾患の機能情報を蒐集し、治療経験と合わせることができれば、患者予後の推測、治療薬剤の選択などに役立つことである。

研究成果の概要(英文)：Study of neonatal Nav1.5 variant with a gain-of-function type mutation R1623Q associated with severe fetal/neonatal arrhythmia was conducted by automated patch-clamp technique using stable expression cell lines of the variants with or without the mutations. The R1623Q mutation slowed decay of the Na current (INa) markedly and increased the late INa. The neonatal variant decreased peak INa. Neonatal variant with R1623Q mutation also decreased the peak INa, slowed the decay, and increased the late INa. These results suggested that the neonatal variant with R1623Q mutation might associate with severe arrhythmia by augmentation of the late INa in the intrinsically low INa in the fetal/neonatal period.

We generated iPS cell lines from two patients with the R1623Q mutation, and differentiated into cardiomyocytes. Functional analyses showed that the iPS cells derived cardiomyocytes prolonged FPD (QT) and HERG inhibitor E4031 induced arrhythmia like changes in the field potential recordings.

研究分野：先天性心血管疾患の遺伝子解析と機能解析

キーワード：SCN5A LQT3 疾患iPS細胞 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓の電氣的な働きは、イオンチャンネルを介した Na, Ca, K などのイオンの移動に依存する。心臓の主なナトリウム (Na) チャンネルである電位依存性 Na チャンネル 1.5 (Nav1.5) をコードする SCN5A 遺伝子の遺伝子変異による疾患には、QT 延長症候群 3 (LQT3)、ブルガダ症候群、心伝導障害、洞不全症候群、心房細動、拡張型心筋症などがあり、重篤な心疾患の原因となる。5,000 人に 1 人の割合で発生し、約 2 万人の小児や成人患者がいる。

(2) Nav1.5 新生児型バリエントは、Neuroblastoma で発見され¹⁾、悪性の乳癌で高発現し転移を促し^{2,3)}。成人型のエクソン 6b の代わりに 6a が用いられるスプライシングバリエントであり (図 1)、胎児・小児期に高発現する (図 2)⁴⁾。近年、新生児型バリエントにある種の gain-of-function 型の遺伝子変異が加わると、成人型より重篤な QT 延長を生じた^{5,6)}。心臓における新生児型と成人型バリエントは、発達に従い成人型に移行し、L409P ミスセンス変異と R558 ナンセンス変異の場合、新生児型バリエントで、成人型に比べてチャンネル活性の不活化の遅延が亢進した⁵⁾。胎児性不整脈における SCN5A 変異は複数知られるが、R1623Q 変異 (図 1) は代表的な変異とされる^{6,7)}。筆者らも、1997 年に LQT 女児の孤発例の Nav1.5 R1623Q 変異を同定した⁸⁾。R1623Q 変異について胎児の重篤な不整脈により、同じ母親からの 2 回の流産と 1 児のみ生後 5.5 ヶ月の心移植で救命という症例が報告され、この繰り返す流産の原因が母親のモザイク SCN5A R1623Q 由来のものであると結論された⁹⁾。これらの文献的検討から「Nav1.5 R1623Q 変異をもつ胎児・新生児重症不整脈の疾患の原因は、胎児・新生児期に高発現する新生児型バリエントによる増悪に由来する」のではないかと仮説を得た。

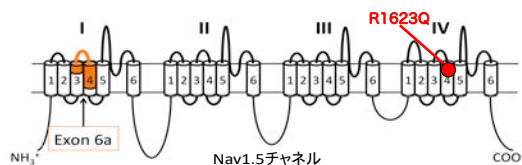
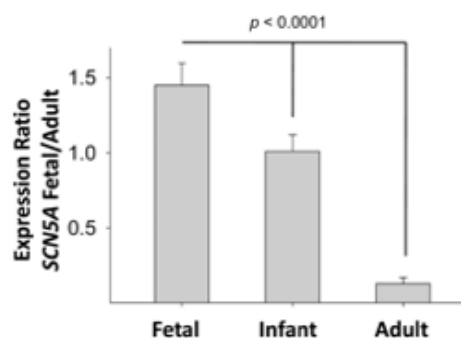


図1 心Naチャンネル (Nav1.5)の模式図
エクソン6aとR1623Qの位置を示す



Murphy LL et al. Heart Rhythm . 2012 April ; 9(4): 590-597.

図2 新生児バリエントは、胎児・新生児期に成人型に比べて高発現する

2. 研究の目的

(1) 「Nav1.5 R1623Q 変異をもつ胎児・新生児重症不整脈の疾患の原因は、胎児・新生児期に高発現する新生児型バリエントによる増悪に由来する」という仮説を証明するために、本研究では、電気生理学的に、Nav1.5 新生児型バリエントにおける R1623Q 変異と、成人型や変異を含まない新生児型などと比較し、その変異に伴う特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Nav1.5 発現細胞を用い変異による Na 電流波形の変化を検討

ハイグロマイシン選択性を付与する pSF-CMV-Ub-hygromycin-SV40 プラスミド (Sigma-Aldrich) に、全ヒト SCN5A コード域を挿入し、成人型 Nav1.5 哺乳類発現ベクターを構築した。新生児型エクソン 6a はヒト胎児心 total RNA (BioChain) から cDNA を調製し、SCN5A エクソン 6a を含む cDNA を PCR 増幅し、成人型 SCN5A の該当領域を 6a に交換して新生児型 SCN5A を作製した。R1623Q 変異の導入には QuickChangeXL キット (アジレント) を用いた。すべての SCN5A コンストラクトのコード領域の塩基配列をシークエンスにより確認した。これらの発現ベクターを 293T 細胞に導入し、ハイグロマイシンに対する抗生剤耐性を用いて選別・クローン化した。免疫染色とウエスタンブロット法により目的チャンネルの細胞内発現を確認して、Nav1.5 恒常発現細胞株を複数作製した。これらの Nav1.5 発現細胞を用い、オートパッチクランプ (Syncropatch 384, Nanion Technologies) により、Na チャンネルの機能分析を行った。パッチクランプ実験は、いずれも保持電位 -100mV で実施した。外液組成 (in mM): TEA 3.5, NaCl 135, KCl 4, CaCl₂ 3.5, HEPES 10, and glucose 10 (pH 7.4), 内液組成 (in mM): CsF 110, CsCl 10, NaCl 10, HEPES 10, and EGTA 10 (pH 7.2). Boltzmann 式 ($I = I/[1 + \exp(Vt - V_{1/2})/k]$) を用いて V_{1/2} を算出した。

(2) 疾患 iPS 細胞由来の分化心筋細胞を用いた機能解析

① Nav1.5 R1623Q 変異を持つ 2 患者並びに健常者の B 細胞からエプスタイン・バーウイルス感染法により、不死化 B 細胞株を作製した。この不死化 B 細胞に山中因子 (マウス p53DD (dominant-negative), ヒト c-MYC, LIN28, SOX2, KLF-4, OCT3/4 を挿入されたエピソーマルプラスミド) を電気穿孔法により導入し、3-4 週間培養し、iPS 細胞コロニーを得た。形状の良い iPS コロニーをコロニーピックにより選択し、継代により性質の安定した複数の iPS 細胞ラインを作製した。SCN5A 及び LQT1, 2 など不整脈関連遺伝子群について塩基配列を読み、他の

変異の有無を確認した。免疫染色法を用いて未分化（多分化能）マーカー（TRA-1-60、SSEA4、OCT4、NANOG）の発現、核型解析による染色体に変異がないこと、テラトーマ形成により 3 胚葉組織分化能（多分化能）を確かめた。

② 心筋細胞への分化は、Lian X.らの方法¹¹⁾に従い、フィーダーフリー培養の iPS 細胞を単細胞とし、12 ウェルプレートを用いて接着培養を開始（Day -3）、3 日後中胚葉分化誘導のため CHIR99021 を添加して 37°C CO₂ インキュベーター内で継続培養した（Day 0）。Day 3、心筋誘導のため WNT シグナル阻害剤（1 μM IWP4）を含む培地に交換した。Day 8~10 で自発的に拍動する心筋前駆細胞を得た。心筋特異的蛋白質や Nav1.5 の発現を免疫組織科学的に検出した。ヒト iPS 及び分化心筋細胞における新生児型と成人型のバリエーションの発現を定量 PCR 法により測定した。

③ 分化心筋細胞は、1) マルチ電極アレーシステム（MED64）を用いて電気生理学的特性の評価を行った。心電図の QT 間隔に該当する細胞外電位や拍動頻度を計測し、チャネルの変異による QT 間隔延長などの評価を行った。2) 薬理学的研究にも MED64 システムを用い、分化心筋細胞に human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) 阻害剤である E4031 や β 作動薬や Na 遮断薬等を種々の濃度で添加し細胞外電位等を測定した。3) オートパッチクランプ法を用いて、Na チャネルの機能分析を行った。

4. 研究成果

(1) R1623Q 変異及び新生児型バリエーションによる Nav1.5 電流への影響

成人型、新生児型、成人型 R1623Q 変異、新生児型 R1623Q 変異の Nav1.5 恒常発現 293T 細胞株を用いて、オートパッチクランプ法により、各 Na チャネルの電流を検出した。保持電位-100 mV から、10 mV ごとの刺激を与えた場合の内向き Na 電流の波形（図 3a）から、成人型に比べ、新生児型と R1623Q 変異では、細胞の大きさで補正したピーク Na 電流（pA/pF）の減少が見られた。図 3a, b, c に、-30 mV 刺激時の Na 電流（pA/pF）を、ピーク電流に対する相対的として示した。R1623Q 変異による速い不活性化の遅延が明らかであり（図 3b）、50 msec における R1623Q 変異による遅延電流に大きな増加、並びに 250 msec における R1623Q 変異及び新生児型による持続電流の増加が検出された（図 3c, 3d）。

固定電位を変化させて流れる電流を測定し、電位に対してプロットした電流（pA/pF）/電圧曲線を図 4a に示した。ピーク pA/pF 値は、成人型（-349.8）に比べ新生児型（-196.2）、成人型 R1623Q（-247.2）と減少し、新生児型 R1623Q（-160.5）で最も減少した。

定常状態活性化曲線を図 4b に示した。50%活性化電位は、成人型で-60.3 mV、新生児型で-48.2 mV、成人型 R1623Q で-58.0 mV、新生児型 R1623Q で-47.9 mV あった。成人型に比べ新生児型では約 10 mV の脱分極側へシフトが生じた。すなわち、新生児型では、Na チャネルの開口が抑制されることが示唆された。野生型と R1623Q 変異では、成人型で約 2 mV、新生児型で 0.3 mV の脱分極側へシフトが検出された。すなわち、R1623Q 変異は、Na チャネルの開口をわずかに抑制することが示唆された。

定常状態不活性化曲線を図 4c に示した。50%不活性化電位は、成人型で-75.0 mV、新生児型で-75.7 mV、成人型 R1623Q で-79.0 mV、新生児型 R1623Q で-79.9 mV であった。成人型や新生児型に比べ、R1623Q 変異を含む場合、50%不活性化電位が約 4 mV 過分極側にシフトしたことから、R1623Q 変異は、Na チャネルのアベイラビリティの低下を促すことが示された。

以上の結果から、成人型 Nav1.5 における R1623Q 変異は、ピーク pA/pF 値を低下させるが、速い不活性化を妨げ、持続 Na 電流を増やすことにより、Na 電流を増加させて、LQT3 症状に寄与すると考えられる。新生児型 Nav1.5 バリエーションは、胎児期には成人型より多く、新生児期には成人型と同レベルで発現する。新生児型 Nav1.5 電流は、成人型と一致した波形を示すが、ピーク電流値（pA/pF）が低下し、定常状態活性化曲線は脱分極方向に 10 mV シフトすること

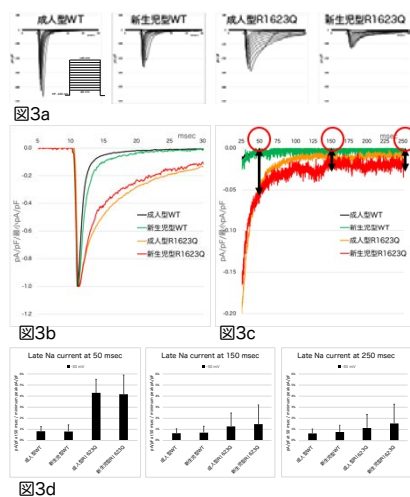


図3 成人型、新生児型、成人型 R1623Q、新生児型R1623Q Nav1.5電流波形と持続電流

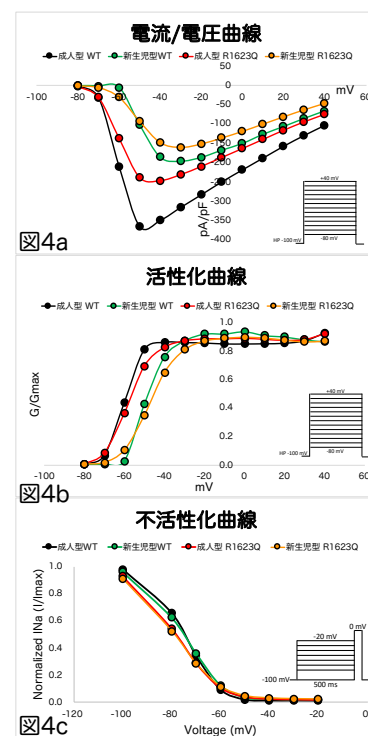


図4 成人型、新生児型、成人型 R1623Q、新生児型R1623Q Nav1.5 電流の解析

からチャネルの開口抑制が生じる。今回の試験結果から、新生児型バリエーションは、成人型と同等の波形を示すが、成人型に比べてNa電流が低下する性質を持つことが明らかとなった。R1623Q変異が新生児型バリエーションに存在すると、成人型の場合と同様にピーク pA/pF 値を低下させ、速い不活性化を妨げ、250 msec においては持続 Na 電流を成人型に比べてより増加させた。R1623Q 変異による胎児・新生児期 LQT の増悪は、本来成人期より低い胎児・新生児期の Na 電流を、本変異が相対的に増大させることによるのではないかと考えられた。本研究におけるリミテーションとしては次の項目が考えられる。1) 患者は Nav1.5 遺伝子の変異を一つの対立遺伝子にもつヘテロである。本研究では、野生型、変異型をホモで発現する哺乳類発現系で実験した。2) R1623Q 変異並びに新生児型バリエーションの野生型に対するドミナントネガティブ効果の検証を行うことが必要である。3) Nav1.5 はβチャネル(β1-4)などと相互作用をして電流を生じる。βチャネルは、胎児・新生児期に成人とは異なる発現率であることから、胎児・新生児期に主要なβチャネルとの相互作用により受ける影響を検証すべきである。

(2) iPS 細胞由来の分化心筋細胞を用いた機能解析

① Nav1.5 R1623Q 変異を持つ2患者の末梢血由来の不死化 B 細胞株から iPS 細胞を樹立した。1番目の症例(#1)は、胎児期に心室頻拍(VT)をおこし、母体にメキシレチンを投与、出生に至る。その後も VT 発作によると思われる痙攣を繰り返し、二歳半で痙攣重積発作を契機に VT ストームとなり、この後から寝たきりになり、胃瘻増設を行っている。症例#2は、妊娠37週より胎児不整脈。出生後、多源性PVC頻発、非持続性VT。キシロカイン、メキシレチンで回復した。表1に発症年齢などの患者情報をまとめた。図5aに、SCN5A 遺伝子のシーケンス解析時に認められた変異ピークを示した。尚、図5bに2症例の家系図を示したが、発端者の両親には、本変異は認められず、両症例とも孤発例であった。

上記2患者の末梢血由来の不死化 B 細胞に山中因子を導入し、iPS 細胞を得た。免疫染色法を用いて未分化(多分化能)マーカー(図6 緑色 6a TRA-1-60、6b SSE4、6c OCT4、赤色 繊維状アクチン、青色 核)の発現(症例1)を確かめた。樹立した iPS 細胞からゲノムを抽出し、SCN5A 及び LQT1, 2 など不整脈関連遺伝子群について塩基配列を読み、他の変異の有無を確認したところ、SCN5AR1623Q の変異を確認し、患者オリジナルの遺伝子解析で得たものとすべて同一の結果を得た。症例#1の iPS 細胞はテラトマ形成実験により、内胚葉・中胚葉・外胚葉への多分化能の検証を済ませた。

② 健常者並びに LQT3 患者 iPS 細胞を中胚葉細胞へ誘導し、続いて心筋細胞へ分化させた。Day 8~10 で自発的に拍動する心筋前駆細胞を得た。iPS 細胞のマーカーとして Oct4 mRNA の発現を経日的に定量 PCR 法により追跡すると、iPS 細胞で高発現するが、心筋の自発収縮活動が始まる Day7 頃にはほぼ消失した。心筋細胞のマーカーとしてトロポニン T は、Day7 以降に継続的に発現したが、ヒト心筋 total RNA (BioChain) における発現と比較すると、成人の心筋よりは低く、胎児心並みの発現レベルを示した(図7 健常者 iPS-心筋細胞の解析結果)。

③ マルチ電極アレイシステム (MED64) を用いて分化心筋細胞の電気生理学的特性の評価を行った。本システムは、多点平面電極であり、ガラス基板上に64個の平面微小電極がパターンニングされており(MEDプローブ)、この電極上に細胞を接着培養して、平面微小電極で細胞外電位を測定できる。図8a, b に示したように、心電図における QT 間隔に相当する細胞外電位持続時間(Field potential Duration, FPD) をスパイクと次のピークまでの時間として測定し、心拍間隔をスパイクとスパイクの間の時間(Interspike interval

表1 R1623Q変異を持つLQT3の2症例

症例	性別	発症年齢	QTc	診断	実施年齢	遺伝子解析			治療	
						遺伝子変異	変異タイプ	参考文献	処置	ICD 挿入年齢
#1	男性	29週	0.58	LQT3	24日	SCN5A Ex28 c.4868 G>A p.R1623Q	ミスセンス変異	Yamagishi (1998) Hum Mutat 11, 481	プロプラノロール、メキシレチン	2歳
#2	女性	37週	0.5	LQT3	11ヶ月	SCN5A Ex28 c.4868 G>A p.R1623Q	ミスセンス変異	Yamagishi (1998) Hum Mutat 11, 481	キシロカイン、メキシレチン	-

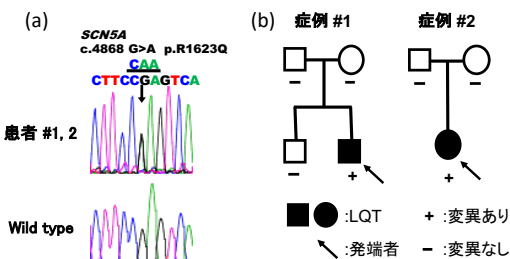


図5 SCN5A遺伝子のシーケンス波形における変異の位置(a), R1623Q変異をもつ2症例の家系図(b)

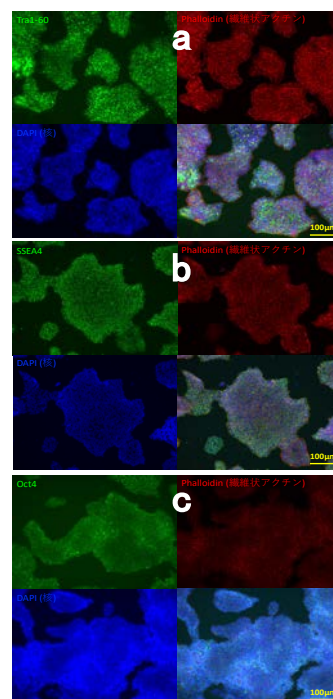
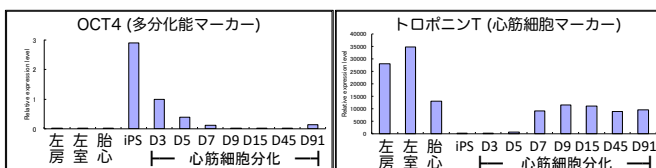


図6 iPS細胞の多分化能マーカーの検出



☆ iPS細胞に発現する多分化能マーカー-OCT4 mRNAは心筋細胞への分化に伴い減少する。
☆ 心筋細胞マーカーであるトロポニンT mRNAは、心筋細胞分化誘導7日目から安定して発現する。

図7 心筋細胞誘導時の発現遺伝子量の経日変化

図8a, b に示したように、心電図における QT 間隔に相当する細胞外電位持続時間(Field potential Duration, FPD) をスパイクと次のピークまでの時間として測定し、心拍間隔をスパイクとスパイクの間の時間(Interspike interval

(ISI, s)として測定し、1分間あたりの拍数 (BPM= 60/ISI) に換算した。QT 間隔は心拍数の影響を受けることから、FPD 値も Fridericia 式を用いて補正し FPDcF 値を求めた (FPDcF = FPD 平均値/(ISI 平均値)^{1/3})。

図 8a, b に MED64 システムによって計測した波形を示した。健常者 iPS 細胞から分化した心筋細胞 (健常 iPS-CM) の波形に比べて LQT3 患者 iPS 細胞から分化した心筋細胞 (LQT3-iPS-CM) の FPD は延長傾向を示した。QTcF 値に相当する FPDcF 値を用いて QT 間隔について評価すると、健常 iPS-CM と LQT3-iPS-CM R1623Q 変異症例#1 では有意な (P<0.0001) 延長が見られ、症例#2 では延長の傾向 (P=0.07) が認められた (図 8c)。

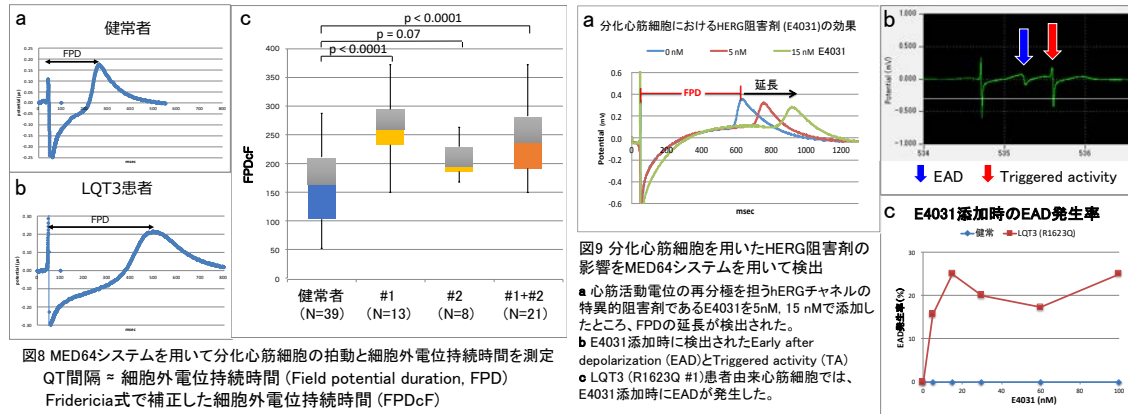


図8 MED64システムを用いて分化心筋細胞の拍動と細胞外電位持続時間を測定
QT間隔 = 細胞外電位持続時間 (Field potential duration, FPD)
Fridericia式で補正した細胞外電位持続時間 (FPDcF)

図9 分化心筋細胞を用いたHERG阻害剤の影響をMED64システムを用いて検出
a 心筋活動電位の再分極を担うhERGチャネルの特異的阻害剤であるE4031を5nM, 15 nMで添加したところ、FPDの延長が検出された。
b E4031添加時に検出されたEarly after depolarization (EAD)とTriggered activity (TA)
c LQT3 (R1623Q #1)患者由来心筋細胞では、E4031添加時にEADが発生した。

E4031 は、心筋活動電位の再分極を担う hERG チャネルを阻害し、QT 延長を促す。iPS-CM を接着培養した MED プロブに E4031 を最終濃度 5 nM, 15 nM で添加したところ、FPD の延長を検出した (図 9a)。LQT3-iPS-CM を試料とした場合、E4031 を添加すると、健常群に比べて高頻度に異常な再分極を示す早期後脱分極 (Early after depolarization, EAD)や誘発活動 (Triggered activity)を検出した (図 9b, c)。

iPS-CM の Na 電流をオートパッチクランプ法により測定した。健常 iPS-CM に比べて LQT3-iPS-CM (R1623Q 変異症例 #1) では、Na 電流の不活性化の遅延が検出された (図 10)。これは、Nav1.5 チャネル R1623Q 変異による Na 電流の充進の一部と考えられた。iPS-CM は、心筋細胞としては未成熟で胎児心筋に近い。本研究においてもトロポニン T の発現は胎児心並みであった。前述の Nav1.5 恒常発現細胞によるパッチクランプ実験の結果を考慮すると、心筋細胞における Nav1.5 R1623Q 変異による Na 電流の充進が QT 延長をもたらすと考えられた。

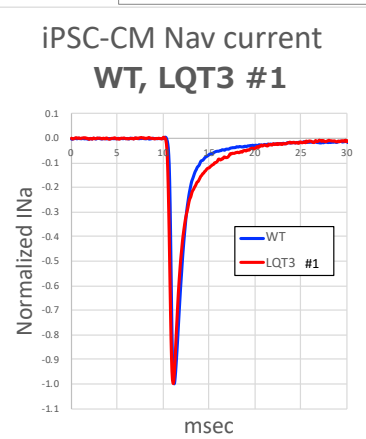


図10 オートパッチクランプ法により iPS心筋細胞のNav1.5電流を測定

<引用文献>

- ① Ou S-W., et al, Eur J Neuroscience, 2005
- ② Fraser SP., et al, Human Cancer Biology, 2005
- ③ Brackenbury WJ., et al, Brest Cancer Res Treat, 2007
- ④ Chioni A-M., et al, J Neuroscience Method, 2005
- ⑤ Murphy LL., et al, Heart Rhythm, 2012
- ⑥ Wang T., et al, Heart Rhythm, 2012
- ⑦ Cuneo BF., et al, J Electrocardiology, 2016
- ⑧ Yamagishi H, Furutani Y, et al, Human Mutation, 1997
- ⑨ Miller TE., et al, Circulation, 2004
- ⑩ Wang DW., et al, Circ Arrhythmia Electrophysiol, 2008
- ⑪ Lian X., et al, NATURE protocols, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古谷喜幸、羽山恵美子、川口奈奈子、島田光世、松岡瑠美子、稲井慶、中西敏雄、杉山 央
2. 発表標題 新生児期に重篤な不整脈を示したLQT3患者2名のiPS細胞由来心筋細胞を用いたin vitroモデルの心機能評価
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽山恵美子、古谷喜幸、川口奈奈子、島田光世、松岡瑠美子、稲井慶、中西敏雄、杉山 央
2. 発表標題 不死化B細胞由来iPS心筋細胞の分化誘導法の改善
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷喜幸、羽山恵美子、川口奈奈子、勝部康弘、島田光世、松岡瑠美子、稲井慶、中西敏雄、杉山 央
2. 発表標題 新生児期に重篤な不整脈を示したLQT3患者のiPS細胞由来心筋細胞を用いたin vitroモデルの心機能評価
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽山恵美子、古谷喜幸、川口奈奈子、勝部康弘、島田光世、松岡瑠美子、稲井慶、中西敏雄、杉山
2. 発表標題 Nav1.5新生児型バリエーションとgain-of-function型の遺伝子変異による胎児・新生児期不整脈の憎悪についての電気生理学的検討
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽山恵美子
2. 発表標題 Syncropatch 384を用いた心疾患関連変異Nav1.5チャネルの測定
3. 学会等名 Nanion・東京女子医科大学イオンチャネルフォーラム2019
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
研究分担者	羽山 恵美子 (Hayama Emiko) (00349698)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	

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
---------	---------