

令和 4 年 9 月 3 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11001

研究課題名(和文)酸化脂肪酸による細胞死誘導機構の解明とネットワークモデルの構築

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of cell death induced by oxidized fatty acids and construction of the network model

研究代表者

井内 勝哉 (Iuchi, Katsuya)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 腫瘍診断・予防科・技師

研究者番号：40553847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：不飽和脂肪酸は酵素的・非酵素的に酸化され、細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能する酸化脂肪酸に変化する。本研究では、多くの疾患に関わる脂質過酸化を介した細胞死ネットワーク機構に注目し、酸化脂肪酸の細胞内における役割を明らかにするために実験を実施した。その結果、酸化脂肪酸によって誘導される細胞死において、細胞内の酸化還元機構の破綻を伴う凝集体の存在やオルガネラおよび細胞膜の損傷が確認された。また、それらの細胞死を制御する様々な物質の存在が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年注目されている脂質過酸化を介した細胞死について、酸化脂肪酸を使用して解析したものである。また、オルガネラの関与や最終的に生じる細胞膜損傷に至るまでの過程について、*in vitro*実験によってその一部を明らかにした。脂質過酸化を介した細胞死は虚血再灌流障害や神経変性疾患などの一因であるため、そのシグナル経路の一端の解明は治療法開発につながると考えられる。さらに、それらの細胞死を制御する抗酸化物質を含む化合物の化学的特性に関する多くの知見も得ており、未解明の細胞死機構の解明といった医学・生物学的な意義に加えて、食品化学分野においても役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are oxidized by reactive oxygen and nitrogen species, which play function as cellular mediators for various diseases. In the present study, we focused on the lipid peroxidation-mediated cell death and investigated the role of the oxidized PUFAs in the cell death signaling pathways. Aggregation and disruption of organelle and plasma membrane was observed in the lipid peroxidation-mediated cell death. We also found that various compounds regulating the lipid-peroxidation mediated cell death.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞死 オルガネラ 脂質ヒドロペルオキシド 脂質過酸化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ドコサヘキサエン酸 (DHA), エイコサペンタエン酸 (EPA), アラキドン酸 (ARA) などの多価不飽和脂肪酸は生体膜リン脂質成分としての機能だけでなく, 様々な酵素によって代謝された産物が細胞内シグナル伝達経路の脂質メディエーターとして機能する。また, 活性メチレン基を多数有する多価不飽和脂肪酸は, 光, 熱, 金属, 過酸化物によって脂質過酸化連鎖反応が容易に誘起される。この非酵素的反応によって生じた「酸化脂肪酸」は, 脂質ヒドロペルオキシド (LOOH), アルデヒド, ケトンなどを含み, その構造の差異や量により炎症性疾患に関わる生体内の反応を正と負の両方に制御する。特に, 虚血性再灌流障害, 神経変性疾患, がんなどの疾患において, 酸化脂肪酸はその原因または結果として生じる反応性物質である。不飽和脂肪酸の酸化によって生じた酸化脂肪酸の疾患への関与は多数報告されているが, 酸化脂肪酸の役割や細胞内シグナル経路の詳細は未解明である。また, 細胞生存と細胞死といった細胞運命を制御する酸化脂肪酸が注目を浴び, 網羅的解析 (リポドミクス) による生命現象理解が試みられている。そこで, 種々の疾患に関与する酸化脂肪酸によって誘導される細胞死に着目し, 細胞内シグナルネットワークを統合的に理解することが必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

細胞内の脂質過酸化反応により生じた反応性の高い酸化脂肪酸は, 細胞内のシグナル伝達を介して炎症性疾患を制御するにも関わらず, その正確な細胞内の役割は未解明である。本研究では, 酸化脂肪酸について化学的に分析し, 細胞死に関わる酸化脂肪酸を同定することを目的とした。また, 脂質過酸化反応によって生じる酸化脂肪酸を基軸にして, オルガネラの関与を検討することを目的とした。さらに, 得られた実験データと既存データを利用して, 細胞運命ネットワークモデルを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂肪酸の空気酸化

アルミパウチ内に 80%窒素と 20%酸素を充填し, その中でドコサヘキサエン酸 (DHA), エイコサペンタエン酸 (EPA), アラキドン酸 (ARA), リノール酸 (LA) を空気酸化させた。酸化した脂肪酸は OxDHA, OxEPA, OxARA, OxLA と表記する。酸化脂肪酸の酸化は Liperfluo との反応による蛍光強度の増加により解析した。

#### (2) 培養細胞

ヒト前骨髄性白血病由来株 HL-60, ヒト急性単球性白血病由来株 THP-1, ヒト胎児腎臓上皮細胞由来株 293T, ヒト結腸腺癌由来株 DLD-1, アフリカミドリザル腎臓由来株 COS-7 を用いた。10%非働化ウシ胎児血清 (FBS) と抗生物質を加えた RPMI1640 もしくは DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地を使用し, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> の条件にて細胞を培養した。

#### (3) 細胞解析

細胞生存率は CCK-8 を用いて測定した。細胞内の形態的变化は顕微鏡 (Leica DM IL LED) を用いて観察した。細胞膜の脂質過酸化は C-11 BODIPY (581/591) により染色し, フローサイトメトリーにより検出した。テトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) を用いた染色により, ミトコンドリア膜電位を測定した。LipiRADICAL Green を用いた染色によって, 脂質ラジカルを検出した。Propidium iodide 染色により細胞膜損傷を伴った細胞死を確認した。細胞内の不良タンパク質を ProteoStat タンパク質凝集測定アッセイにより検出した。

#### (4) 炎症性サイトカインの測定

THP-1 細胞またはホルボール-12-ミリストート-13-アセタート (PMA) 処理した THP-1 細胞から細胞培養液に分泌した炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 量を enzyme-linked immunosorbent assay によって測定した。

#### (5) タンパク質解析

全細胞抽出液は RIPA バッファー [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 2.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and protease inhibitors] によって抽出した。核抽出液と細胞質抽出液の作製は Nuclear/Cytosol Fractionation Kit を用いた。細胞内のミトコンドリアと細胞質のタンパク質を Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit で抽出した。各タンパク質に対する抗体を用いた Western Blot 法により発現量を解析した。

#### (6) 細胞ネットワーク解析

過去の文献と本研究によって得られて結果をもとにして, 細胞死シグナルネットワークモデルを作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脂肪酸または酸化脂肪酸によって誘導される細胞死

OxDHA 処理した THP-1 細胞において、細胞膜損傷を伴った細胞死が検出された。また、アポトーシスの指標であるカスパーゼ 3/7 の活性化や細胞表面へのフォスファチジルセリンの露出が確認された。さらに、全カスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk が、OxDHA によって誘導される THP-1 細胞および DLD-1 細胞の細胞死を抑制した。これらの結果から、OxDHA 処理によって誘導される細胞死において、アポトーシスシグナル経路の活性化が示唆された (Iuchi K., *et al.*, *Mol. Med. Rep.*, 2019)。

THP-1 細胞や DLD-1 細胞よりも酸化ストレスに対して感受性の高い HL-60 細胞を用いて、DHA および OxDHA の影響を確かめた。その結果、DHA および OxDHA 処理によりミトコンドリア損傷を介した細胞死が観察された。処理時間依存的にシトクローム *c* がミトコンドリア内から細胞質に放出された。また、鉄キレート剤であるデフェロキサミンが DHA 処理により誘導される細胞死を抑制した。一方で、zVAD-fmk によって細胞死が抑制されなかったことから、この細胞死は非アポトーシス細胞死であると考えられる。この結果は、細胞内での酸化反応を触媒する鉄を含めた金属が、脂肪酸によって誘導される細胞死に重要であることを示唆する。デフェロキサミンは脂質過酸化を介した非アポトーシス細胞死であるフェロトーシスの阻害剤である。また、鉄代謝の恒常性破綻によりフェロトーシスが誘導されることから (Chen X.*et al.*, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020)、酸化脂肪酸による HL-60 細胞の細胞死において鉄依存性のフェロトーシスの関与が示唆された。

DHA と OxDHA で処理した 293T 細胞で生じる細胞死について解析した結果、アポトーシス阻害剤 zVAD-fmk とフェロトーシス阻害剤フェロスタチン-1 によって有意に抑制された。したがって、酸化脂肪酸はアポトーシスとフェロトーシスの両方を誘導することが示唆された。また、OxDHA 処理した 293T 細胞内において著しい脂質ラジカルの増加が確認された。これらの結果は、酸化脂肪酸によって誘導される 293T 細胞の細胞死において、脂質ヒドロペルオキシドから生じた脂質ラジカルが重要な役割をしていることを示唆する。また、細胞内の脂質ヒドロペルオキシドによってアポトーシスやフェロトーシスが誘導されると考えられる。

DHA や EPA と比較すると不飽和度の低い LA を用いて、HL-60 細胞の脂質ヒドロペルオキシドに対する感受性を確かめた。その結果、脂質ヒドロペルオキシド量の指標である過酸化物質価 (Peroxide Value; PV) に依存した細胞生存率の低下が確認された。この結果は、LA においても脂質ヒドロペルオキシドが細胞死を誘導することを示唆する。近年、小胞体に存在するオキシドレダクターゼによって特定のリン脂質ヒドロペルオキシドが産生され、それによりフェロトーシスが誘導される (Zou Y.*et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2020)。したがって、あらゆる細胞死シグナル経路において、脂質ヒドロペルオキシドがハブ的な役割をしていると考えられる。

##### (2) 脂質ヒドロペルオキシドにより誘導される細胞死

生体膜脂質過酸化を介した細胞死の詳細を明らかにするため、脂肪酸や酸化脂肪酸を用いた実験に加え、脂質ヒドロペルオキシドである TBHP を用いた実験を実施した。TBHP 処理した 293T 細胞または COS-7 細胞において生じる細胞死は、zVAD-fmk によって抑制されなかったことから、非アポトーシス細胞死であることが確かめられた。また、フェロトーシス阻害剤であるデフェロキサミン、フェロスタチン-1、 $\alpha$ -トコフェロール(ビタミン E)前処理により、その細胞死が有意に抑制された。これらの結果から、TBHP によって誘導される細胞死はフェロトーシスであると考えられる (未発表)。

脂質ヒドロペルオキシドにより誘導される細胞死の効果的な阻害方法を見つけるべく、 $\alpha$ -トコフェロールの化学的特性に注目して細胞死への影響を確かめた。 $\alpha$ -トコフェロールのコロイド粒子サイズを小さくすることにより、細胞死抑制活性が有意に増強した。また、シクロデキストリンに包接した  $\alpha$ -トコフェロールは、 $\alpha$ -トコフェロールよりもミトコンドリアを保護し、著しく細胞死を抑制した。さらに、シクロデキストリン包接  $\alpha$ -トコフェロールは細胞膜脂質過酸化と細胞内グルタチオン量減少を有意に軽減させた (未発表)。これらの結果から、脂質ヒドロペルオキシドによる細胞死において、細胞膜脂質過酸化に加えてミトコンドリアを含むオルガネラ損傷やグルタチオン代謝系が関与していると考えられる。

脂質過酸化を介した細胞死における形態的变化を解析した結果、パイロトーシス様の特徴的な形態変化を観察した。また、抗酸化物質を含むフェロトーシス阻害剤は、これらの形態変化を抑制した。近年、フェロトーシスにおける細胞膨潤に関する研究が盛んであり、細胞膜の孔形成が発見されている (Pedrera L. *et al.*, *Cell Death. Differ.*, 2020, Riegman M.*et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2020)。本研究の細胞死においても細胞膜孔形成に関与する経路が活性化していると推測される。

不良タンパク質が増加する神経変性疾患と脂質ヒドロペルオキシドとの関係を調査した。その結果、TBHP や酸化脂肪酸で処理した細胞内において、不良タンパク質が有意に増加した。また、フェロトシス阻害剤(ディフェロキサミン, フェロスタチン-1)とグルタチオンの前駆体(N-アセチルシステイン)が、細胞内不良タンパク質蓄積を軽減した。これらの結果は、OxLDLによって誘導される細胞死において、脂質ヒドロペルオキシドが不良タンパク質含む凝集体を蓄積させることを示唆する。この細胞死の結果もしくは原因として細胞内のタンパク質の恒常性が破綻している可能性が考えられる。

### (3) 金属化合物により誘導される細胞死

上記で示すように、脂質ヒドロペルオキシドによる細胞死は、鉄や銅などの金属が触媒する酸化反応、細胞内グルタチオン量の低下、ミトコンドリアを含むオルガネラ損傷を介して引き起こされる。有機ビスマス化合物はがん細胞に対し細胞内グルタチオン量を低下させ、濃度依存的にアポトーシスと非アポトーシスを誘導する(Iuchi K., *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 2008)。このように、有機ビスマス化合物は脂質ヒドロペルオキシドと同様の生物活性を有する。そこで、ビスマス化合物を酸化剤として利用して、細胞内の脂質過酸化および細胞死を解析した。その結果、ビスマス化合物の濃度依存的に脂質過酸化を介した非アポトーシス細胞死が誘導された(Iuchi K., *et al.*, *Anti-Cancer Drugs*, 2020)。また、DLD-1 細胞や 293T 細胞にオートファジーを誘導した。これらの結果から、細胞内において生じた酸化ストレスによって、細胞膜の脂質過酸化、グルタチオン合成系の恒常性の破綻、オートファジーなど様々なシグナル経路が同時に活性化されていると考えられる(未発表)。

フェロトシスにおいて、Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2(NRF2)と Kelch-like ECH-associated protein 1(KEAP1)が重要な役割を果たす。ある種の酸化脂肪酸は KEAP1 に結合することで、NRF2 が KEAP1 から解離して核内に移行し、転写因子として機能する。NRF2 活性化によりグルタチオン合成系酵素発現が誘導されるため、その結果として炎症や細胞死が抑制される。一方で、ある一定以上の酸化脂肪酸を処理したマクロファージでは、NRF2 は活性化されずに細胞死が誘導される。ビスマス化合物も酸化脂肪酸同様に NRF2 を活性化させた。また、ある一定以上の濃度において NRF2 の活性化を伴わない細胞死が誘導された(Iuchi K., *et al.*, *Biomed. Pharmacother.*, 2020)。

### 【まとめ】

不飽和脂肪酸の酸化を介して誘導される細胞死において、脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)の関与が確かめられた。また、細胞内に存在する鉄がその細胞死に重要であることが示唆された。さらに、アポトーシスに加えて、近年注目を浴びる生体膜の脂質過酸化を介した非アポトーシス細胞死のひとつであるフェロトシス経路の関与が示唆された。図のように、脂質ヒドロペルオキシドを中心として、オルガネラを介した細胞死のシグナル伝達ネットワークモデルが考えられる(Iuchi K *et al.*, *Biology*, 2021, Iuchi K, *アグリバイオ*, 2021)。これらの結果は、脂質過酸化を介した複雑な細胞死機構の解明において有用であると同時に、酸化ストレス関連疾患の新たな治療法の開発に役立つと考えられる。

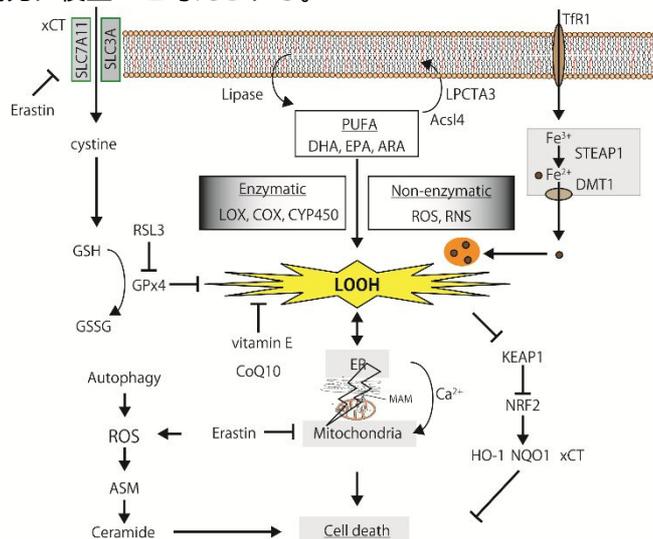


図 不飽和脂肪酸から産生した脂質ヒドロペルオキシドによる細胞運命決定シグナル経路 (Iuchi K *et al.*, *Biology*, 2021 より引用し抜粋)

<引用文献>

- Lohans Pedrera, Rafael A. Espiritu, Uris Ros, Josephine Weber, Anja Schmitt, Jenny Stroh, Stephan Hailfinger, Silvia von Karstedt, Ana J. García-Sáez. Ferroptotic pores induce Ca<sup>2+</sup> fluxes and ESCRT-III activation to modulate cell death kinetics *Cell Death Differ.* 28, 1644-1657 (2021)
- Katsuya Iuchi, Tomoka Takai, Hisashi Hisatomi. Cell Death via Lipid Peroxidation and Protein Aggregation Diseases, *Biology* 10(5) 399 (2021)
- 井内 勝哉, 「細胞運命を制御する脂肪酸と酸化物質」 *アグリバイオ = Agricultural biotechnology* 5 (2) 140-144 (2021)
- Shigesaburo Ogawa, Haruka Katsuragi, Katsuya Iuchi, Setsuko Hara. Clarification of the Complexation Behaviour of 2,6-di-O-Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin and Vitamin E and Radical Scavenging Ability of the Complex in Aqueous Solution *J. Oleo Sci.* 70(10), 1461-1467 (2021)
- Shigesaburo Ogawa, Mai Shinkawa, Ryuji Hirase, Taro Tsubomura, Katsuya Iuchi, Setsuko Hara. Development of Water-Insoluble Vehicle Comprising Natural Cyclodextrin-Vitamin E Complex *Antioxidants* 10(3) 490 (2021)
- Katsuya Iuchi, Yuji Tasaki, Sayo Shirai, Hisashi Hisatomi, Upregulation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 protein level in the human colorectal adenocarcinoma cell line DLD-1 by a heterocyclic organobismuth(III) compound. *Biomed. Pharmacother.* 125, 109928 (2020)
- Yilong Zou, Haoxin Li, Emily T. Graham, Amy A. Deik, John K. Eaton, Wenyu Wang, Gerardo Sandoval-Gomez, Clary B. Clish, John G. Doench & Stuart L. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis *Nat. Chem. Biol.* 16, 302-309 (2020)
- Michelle Riegman, Liran Sagie, Chen Galed, Tom Levin, Noah Steinberg, Scott J Dixon, Ulrich Wiesner 5, Michelle S Bradbury, Philipp Niethammer, Assaf Zaritsky, Michael Overholtzer Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture *Nat. Cell Biol.* 22(9) 1042-1048 (2020)
- Xin Chen 1 2, Chunhua Yu 2, Rui Kang 2, Daolin Tang Iron Metabolism in Ferroptosis *Front. Cell Dev. Biol.* 8 590226 (2020)
- Katsuya Iuchi, Sayo Shirai, Yuji Tasaki, Hisashi Hisatomi. Heterocyclic Organobismuth(III) Compound Induces Non-apoptotic Cell Death via Lipid Peroxidation. *Anti-Cancer Drugs* 31, 55-59 (2020)
- Katsuya Iuchi, Mika Ema, Moe Suzuki, Chikako Yokoyama, Hisashi Hisatomi. Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells. *Mol. Med. Rep.* 19 (4) 2767-2773 (2019)
- Katsuya Iuchi, Yukichi Hatano, Tatsuo Yagura. Heterocyclic organobismuth(III) induces apoptosis of human promyelocytic leukemic cells through activation of caspases and mitochondrial perturbation. *Biochem. Pharmacol.* 76, 974-986 (2008)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Katsuya Iuchi, Tomoka Takai, Hisashi Hisatomi  | 4. 巻<br>10                |
| 2. 論文標題<br>Cell Death via Lipid Peroxidation and Protein Aggregation Diseases.                       | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>399         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/biology10050399   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Shigesaburo Ogawa, Mai Shinkawa, Ryuji Hirase, Taro Tsubomura, Katsuya Iuchi, Setsuko Hara | 4. 巻<br>10                |
| 2. 論文標題<br>Development of Water-Insoluble Vehicle Comprising Natural Cyclodextrin-Vitamin E Complex  | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Antioxidants   | 6. 最初と最後の頁<br>490 ~ 490   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/antiox10030490  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>井内勝哉   | 4. 巻<br>5                 |
| 2. 論文標題<br>細胞運命を制御する脂肪酸と酸化物質   | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>アグリバイオ   | 6. 最初と最後の頁<br>140-144     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Iuchi Katsuya, Ema Mika, Suzuki Moe, Yokoyama Chikako, Hisatomi Hisashi                    | 4. 巻<br>19                |
| 2. 論文標題<br>Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells            | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Medicine Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>2767 ~ 2773 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3892/mmr.2019.9940   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>高井皆花、井内勝哉、久富寿      |
| 2. 発表標題<br>酸化DHAによる細胞死誘導機序の解明 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本生化学会大会       |
| 4. 発表年<br>2021年               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高井皆花、井内勝哉、久富寿                 |
| 2. 発表標題<br>脂肪酸および酸化脂肪酸による培養細胞への細胞死誘導能の比較 |
| 3. 学会等名<br>第93回日本生化学会大会（Web開催）           |
| 4. 発表年<br>2020年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>井内勝哉、田崎友嗣、川連若菜、久富寿              |
| 2. 発表標題<br>ヒト急性単球性白血病由来株THP-1における炎症反応とNRF2 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会                    |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Katsuya Iuchi, Moe Suzuki, Mika Ema, Hisashi Hisatomi                       |
| 2. 発表標題<br>Mechanisms of cell death induced by oxidized fatty acids in cultured cells. |
| 3. 学会等名<br>日本油化学会第58回年会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|