

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32511

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19633

研究課題名（和文）オプトジェネティクスを用いた生体内骨細胞機能調節法の創生と利用

研究課題名（英文）The development of regulatory methods for osteocyte function using optogenetics

研究代表者

吉田 卓史（Yoshida, Takashi）

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：30455795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：骨組織では骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の3種類の細胞が互いに結びついて連携して機械刺激を受容することで、骨リモデリングが成し遂げられている。この骨リモデリングの詳細なメカニズムは細胞が硬組織に埋まっているために未だ明らかになっていない。我々は近赤外線を用いた光遺伝学的手法により非侵襲的に骨系細胞を操作する手法の確立を目指した。近赤外線の照射により細胞膜へ接着斑の機能を抑制するタンパク質を移行させて細胞接着を弱める機能を持つ人工タンパク質を作成してその効果を確認したところ、いくつかの細胞では細胞の接着面積の減少を起こせた。しかしその効果は未だ薄かったため今後の改良が必要であると考えます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はまだ効率的に細胞の接着を抑制することはできていないが、今後の改良により効率的に近赤外光により細胞の形態を制御できるようになると考える。さらに本研究は人体に深く透過することができる近赤外光を用いて非侵襲的に体の奥深くにある細胞を制御することを最終的な目的としているため、この手法の改良は骨組織のみにとどまらず、体の内奥にある病巣に対する遺伝子治療などにも応用できる手法となると考える。

研究成果の概要（英文）：In the bone, osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes connect each other and regulate bone remodeling by accepting mechanical stimulation. The detailed mechanisms of bone remodeling have not been understood because the bone cells are embedded in hard tissue. This study aimed to develop a method to manipulate bone cells by near-infrared optogenetic pair. We exploited a pair of optogenetic proteins translocated to the cell membrane with near-infrared and suppressing focal adhesion function. Although the efficacy was low, these proteins reduced some cell areas by photo illumination. It remains a challenge for future research to improve the efficiency of photo switchability.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：光遺伝学 細胞接着 近赤外光

1. 研究開始当初の背景

骨リモデリングは骨芽細胞・破骨細胞・骨細胞の3者が相互に連携することにより成し遂げられている。骨組織の中ではミネラル成分に囲まれた骨細胞同士が3次元的に結びついた網目状構造をとっており、骨細胞は神経細胞のように細胞突起(cell process)を伸ばして骨細胞同士、骨細胞-骨芽細胞間で連結して細胞間ネットワークを形成して全体として機械刺激を感知するメカノセンサーネットワークとして機能している。骨細胞の持つ細胞突起には多くの機械刺激受容チャネル(MSチャネル)が発現して骨にかかる力学的負荷を感知し、骨リモデリングの引き金となっているが、骨細胞は骨の中に埋没しているために細胞の単離も長年困難であったため詳細な研究が遅れていた。近年骨細胞の選択的な単離方法が確立したことにより、機械刺激を受けた骨細胞が破骨細胞分化因子 RANKL を大量に発現し破骨細胞を誘導、骨リモデリングを開始していることが明らかとなった⁽¹⁾。しかしながら生体中では骨芽細胞も機械刺激を受容して破骨細胞を制御しており、骨細胞単独でどの程度破骨細胞の分化を制御するのか、切り分けて評価することはできていない。

また、骨細胞は単独で働くわけではなく骨細胞ネットワークが全体として機械刺激を受容して破骨細胞誘導を制御しているため単離細胞では評価しきれない。これらを明らかとするためには単離細胞を用いる実験では不十分であり、是非とも生体中の骨細胞だけを操作する技術が必要であった。

近年急速に発展してきている技術に「光遺伝学」がある。この技術は可視光領域の波長の光により構造を変化させる光応答性タンパク質を利用して細胞機能を制御する方法である⁽²⁾。最も有名なものの一つに channel rhodopsin がある。このタンパク質は青色の光を照射することでチャネル機能を発現し、細胞内に Na⁺を透過させることができる。これを利用して任意のタイミングで神経細胞を興奮させることで神経機能の解析に利用されている。しかしながら現在主流の青色光(450 nm 付近)を励起光とする光応答性タンパク質を利用するには問題があった。それは生体の深い部位に使用しようとする生体に存在する水分やタンパク質により吸収されてしまうということである。一方 650-900 nm の波長域は”生体の窓“と呼ばれ、光が吸収されずに生体の奥深くに到達することができる。この波長域(近赤外光領域)で機能する光応答性タンパク質を分子スイッチとして利用すれば、硬い骨の中に存在する骨細胞も近赤外光により操作できると考えた。

2. 研究の目的

今研究の目的は近赤外光を照射することにより時空間的に任意のタイミングと位置で生体中の骨関連細胞だけを操作する方法の開発である。骨細胞は α_3 インテグリンを介して骨小管に結合し、機械刺激を細胞内シグナルに変換している。この時、Rap1 はインテグリンの活性化に寄与している。この Rap1 の活性を特異的に負に制御する GTP アーゼ活性化タンパク質である Rap1GAP に光応答性タンパク質とヘテロダイマーを形成するタンパク質を結合し、細胞膜には近赤外光応答性のタンパク質を局在させて 740 nm の近赤外光を照射すれば、任意のタイミングで Rap1GAP が細胞膜に運ばれ Rap1 を不活性化することで接着斑の機能を抑制できる。そのため近赤外光の照射により細胞膜へ Rap1GAP を移行させるタンパク質ペアの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞由来の細胞株 HeLa 細胞は 10%FBS、100 unit/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin (富士フィルム和光純薬)を含有した DMEM (Sigma)を用いて 37^oC、5% CO₂、100%湿度の雰囲気下で培養した。マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞株は 10%FBS、100 unit/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を添加した MEM (富士フィルム和光純薬)を用いて 37^oC、5% CO₂、100%湿度の雰囲気下で培養した。

(2)遺伝子導入

近赤外光応答性 Rap1GAP プラスミドは後述するように2種類のプラスミドから成立する。これらを同時に1つの細胞に発現させるためにエレクトロポレーション法を用いた。2種類のプラスミドをそれぞれ 0.5 μ g ずつを使用し、neon transfection system (Thermo Fisher Scientific)を使用して HeLa 細胞と MC3T3-E1 細胞に導入した。導入後の細胞はそれぞれの培地(抗生物質不含)で培養して2日後に使用した。

(3)光刺激

遺伝子導入した細胞は観察の前日にガラスボトムディッシュに播きなおしを行った。光刺激時には培地を Tyrode 液に交換した。顕微鏡は倒立顕微鏡 Ti-U (ニコンインステック)を使用し、ステージ上にはガラスボトムディッシュを常に 37^oC に保つ電子恒温槽 (DTC-300C, ダイヤム

ディカル)をセットした。顕微鏡には CCD カメラ (Orca Spark, 浜松ホトニクス) を接続して画像を取得した。光刺激には高輝度 LED 光源 (740 nm, Mightex) を用い、光照射制御装置である Polygon-1000 を用いて LED 強度 10% で 3 秒照射、7 秒休止の刺激を 10 分間行った。光刺激の前後で細胞イメージを取得して変化が生じたかどうかを評価した。EGFP と mCherry の蛍光タンパク質励起には LED 光源 (niji, Bluebox Optics) を使用した。

4. 研究成果

(1) 近赤外応答性タンパク質のデザイン

近赤外応答性タンパク質としては *RpBphP1/ RpPpsR2* の 2 つのタンパク質セットを使用することにしていたが、*RpPpsR2* の部分配列である QPAS1 でもヘテロダイマーを形成することが報告された⁽³⁾ ため、分子が小さくなる利点があることから本研究では *RpBphP1/ QPAS1* のヘテロダイマーを使用することとした。*RpBphP1/ QPAS1* の優位点は、可逆的に 760 nm の光でヘテロダイマーを形成することと、光応答性タンパク質の核となる受光基 biliverdin を真核生物が発現していることである。これらの配列は Dr. Verkhusa より Addgene を介して入手した⁽⁴⁾。*RpBphP1* には細胞膜への局在化シグナルである CAAX 配列と、細胞内局在を観察するために蛍光タンパク質である mCherry を接続した (BphP1-CAAX)。もう一方である RapGap については、その酵素ドメイン (RapGapdomain) に QPAS1 と、局在確認のための EGFP を接続した (QPAS1-RapGapdomain)。各ドメインの接続には長さの違う複数のリンカーを用いた。これら 2 つのプラスミドを一つの細胞に同時に発現させることにより、740 nm の近赤外光を照射することで照射前に細胞内全体に発現していた QPAS1-RapGapdomain が細胞膜へ移行し、接着斑を阻害することで細胞形態が変化すると考えた。

(2) HeLa 細胞での発現局在

(1) で作成した 2 種類のプラスミドが細胞内で機能するかを調べるために様々な *in vitro* 実験に汎用される HeLa 細胞を用いて調べることにした。プラスミドはエレクトロポレーション法により HeLa 細胞に一過的に発現させその局在を調べた。それぞれのプラスミドを単独で発現させたところ当初の想定通り BphP1-CAAX は細胞膜へ局在していたのに対し、QPAS1-RapGapdomain は細胞全体に広がっていた。次にこれら 2 つのプラスミドを同時に発現させて HeLa 細胞における局在を調べたところ、単独発現とは少し違った局在を示した。BphP1-CAAX については細胞膜へ局在していたため単独発現と同様であった。その反面 QPAS1-RapGapdomain は細胞全体だけではなく一部細胞膜へ移行していた。これは 740 nm の光照射をする前から見られた。環境光により活性化したために細胞膜への移行がおこっているのではないかと考え、観察までに蛍光灯の光も当てないようにしたが抑制はできなかった。この光照射に依らない BphP1/QPAS1 の相互作用は Redchuk 等の論文でも報告されており⁽³⁾、共発現においては一定量生じてしまうものと思われる。

(3) 光刺激による形態変化観察

2 種類のプラスミドの共発現において近赤外光照射前から一部細胞膜上で共局在していることが明らかとなったが、光照射により QPAS1-RapGapdomain の更なる細胞膜への移行がみられるかどうかを調べるために、740 nm の光を 3 秒間照射と 7 秒間休止の割合で照射しこれを 10 分間続けた。そのうち QPAS1-RapGapdomain の局在変化を調べた。その結果、光刺激前から一部細胞膜で共局在の見える細胞では、光照射により QPAS1-RapGapdomain の細胞膜への更なる移行がみられた。それに対し、光照射前に共局在の見えなかった細胞では光照射しても顕著な細胞膜への移行は見られなかった。光刺激における細胞膜への QPAS1-RapGapdomain の移行はあまり顕著ではなく、細胞により移行速度も違っていたが凡そ 5 分ぐらいで移行しているのが観察された。

この光照射により細胞形態に変化があるかどうかを細胞膜に発現している mCherry の蛍光を観察することで検討した。10 分間の光照射前後で mCherry の画像を撮影し、細胞が占める面積を Fiji software (NIH) を用いて計測した。その結果、光照射後の細胞面積の変化率は BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain の共発現 HeLa 細胞において $98.5 \pm 5.7\%$ ($n = 16$) であった。また、ネガティブコントロールとして *RpBphP1* を持たない細胞膜移行 mCherry を QPAS1-RapGapdomain と共発現した HeLa 細胞の細胞面積変化率は $97.2 \pm 4.3\%$ ($n = 8$) であり、ほとんど差がなかった。これらの結果は光照射により QPAS1-RapGapdomain は細胞膜へ移行しても、接着斑を阻害して細胞接着を崩壊させるのはうまくいかなかったと考えられる。しかしながら、BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain の共発現 HeLa 細胞の中には 88.5% まで縮小したものもあり、より強い条件では効率的に接着斑を阻害できるのではないかと考えた。

(4) MC3T3-E1 細胞での発現と光刺激

次に BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain が骨系の細胞である MC3T3-E1 細胞で機能するかどうかを調べた。MC3T3-E1 細胞は非常に強くガラスボトムディッシュに結合しているため、接着斑の阻害効果が見やすいのではないかと考えた。エレクトロポレーション法によりこれら 2 種類のプラスミドを遺伝子導入したところ、BphP1-CAAX の細胞膜への局在は HeLa 細胞の時ほど顕著には見られず、細胞全体に広がっているように観察された。これは細胞膜への局在

がうまくいかなかったわけではなく、MC3T3-E1 細胞があまりに強くガラスボトムディッシュに結合しているため Z 軸方向の細胞の厚みが薄くなってしまったため CCD カメラでは細胞膜に局在しているのか、細胞質に発現しているのか判別がつきにくかったためと考える。両細胞の体積はほとんど差がないにもかかわらず、両細胞の面積を比較すると MC3T3-E1 細胞は HeLa 細胞に対して約 2-3 倍の面積を持っていることからその厚みが薄いことが理解できる。

BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain の共発現をさせた MC3T3-E1 細胞に対して HeLa 細胞と同様に 740 nm (10%)の光照射を 3 秒間照射と 7 秒間休止の割合で照射しこれを 10 分間続けたときの細胞面積の変化率を計測した。その結果、BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain の共発現 MC3T3-E1 細胞においては $77.7 \pm 22.4\%$ ($n = 3$)であったのに対し、ネガティブコントロールである細胞膜移行 mCherry を QPAS1-RapGapdomain と共発現した MC3T3-E1 細胞の細胞面積変化率は $92.7 \pm 4.4\%$ ($n = 3$)であった。両細胞群において t 検定による有意差検定を行ったところ有意差は認められなかった。以上の結果は BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain の共発現により効果的な光刺激による接着斑の崩壊を起こすことはできなかったが、光照射条件の検討をより行うことで効率を上げることができるのではないかという可能性を示すものであった。実際、BphP1-CAAX と QPAS1-RapGapdomain の共発現をさせた MC3T3-E1 細胞に対して 740 nm の光照射を行った細胞の一つは光刺激前後の細胞面積の比較において 46.0%まで縮小した。この細胞は光照射の間に張り付いていた仮足が見る間に細胞中心の方へ収縮し、光照射を停止してもしばらく縮小が続いた。これは光照射により接着斑が崩壊したため収縮したものと考えられる。

以上の結果から得られた知見を基に今後の改善点を 3 つ考えた。まず、*RpBphP1/QPAS1* の光照射前からの相互作用についての改善を図る必要がある。光遺伝学で使用されるさまざまな光応答性タンパク質すべてに共通することであるが、たとえ光に対する反応性が低くとも、光照射をして初めて応答が生じること(S/N 比が高い)の方が有用である。今回のように光照射前から相互作用が生じてしまった場合、スイッチとしての機能は十分に果たせない。そのため QPAS1 と BphP1 の相互作用部位に変異を導入するなどをして、光照射前の相互作用がほとんど生じないように改変を行い、光刺激をした時のみ相互作用するようにする必要がある。

次に光刺激の条件検討を行う必要がある。本研究でも光照射の条件は 10%の 3 秒間照射以外を検討した。光照射の時間や強度をより強い条件にした場合、確かに細胞の面積の縮小は生じたが、同時にネガティブコントロールの細胞でも縮小がみられた。これは強い光を長時間照射したことによる光細胞毒性が生じたためと考える。今後は光細胞毒性が生じない程度の強度で照射する時間を適切にコントロールすることで効果的に光応答性タンパク質を操作する条件を見つける必要がある。

最後に細胞膜へ移行させるタンパク質を他のものに変えることを検討する必要がある。Rap1Gap タンパク質は GAP 活性により Rap1 の活性を抑制するタンパク質であるので、その効果が細胞の面積に現れるには時間がかかることが考えられる。より積極的に接着斑を分解するタンパク質などを細胞膜へ移行させることができれば、細胞面積の減少ももっと短時間で生じさせることができると考える。

光遺伝学が活発に研究されるようになり 10 年ほど経つが、今後一層の基礎研究、臨床応用研究が進展すると考えられる。その中でも生体の奥深くに到達することができる近赤外光を用いる光応答性タンパク質の有用性は今後さらに際立つと考えられるが、その反面未だに近赤外光応答性タンパク質の種類も少なく、反応性も高くないのが欠点である。本研究は硬組織であり物理的に外部から刺激することが難しい骨関連細胞をこの近赤外光を用いて操作することを目的とした。研究当初の目的を達成する良い研究成果は得られなかったが、得られた知見から改善を行うことで当初の目的を達成できると考える。この方法が確立されれば硬組織の機械刺激に対する生理応答のメカニズムを明らかにすることができるだけでなく、将来的には身体内部の病巣に対して体の外部から治療を行う遺伝子治療のツールとしても利用することができるようになると思われる。

引用文献

- (1) Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F., et al. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* *17*, 1231–1234.
- (2) Chernov, K.G., Redchuk, T.A., Omelina, E.S., and Verkhusha, V. V (2017). Near-Infrared Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools Engineered from Phytochromes. *Chem. Rev.* *117*, 6423–6446.
- (3) Redchuk, T.A., Omelina, E.S., Chernov, K.G., and Verkhusha, V. V (2017). Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 633–639.
- (4) Kaberniuk, A., Shemetov, A.A., and Verkhusha, V. V. (2016). A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nat. Methods* *2016* *137* *13*, 591–597.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Kaori, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru	4. 巻 556
2. 論文標題 Mode-selective inhibitory effects of eugenol on the mouse TRPV1 channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 156 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.126	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 Takahashi Kaori, Araki Kentaro, Miyamoto Hideo, Shirakawa Rikimaru, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru	4. 巻 12
2. 論文標題 Capsaicin and Proton Differently Modulate Activation Kinetics of Mouse Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel Induced by Depolarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.672157	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 Izumi M, Yoshida T, Nakamura T, Wakamori M	4. 巻 12
2. 論文標題 Paeonol, an Ingredient of Kamishoyosan, Reduces Intracellular Lipid Accumulation by Inhibiting Glucocorticoid Receptor Activity in 3T3-L1 Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 E309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12020309.	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 Takahashi Kaori, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru	4. 巻 323
2. 論文標題 Periodontal ligaments enhance neurite outgrowth in trigeminal ganglion neurons through Wnt5a production induced by mechanical stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1704 ~ C1719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00302.2022	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 坂口 怜子、高橋 重成、吉田 卓史、小川 臨、植田 誉志史、浜野 智、山口 佳織、澤村 晴志朗、山本 伸一郎、原 雄二、森 誠之、古川 哲史、清水 俊一、井上 隆司、森 泰生
2. 発表標題 TRPC5 チャネル-カベオリン-1-eNOS 複合体による血管内皮細胞におけるCa ²⁺ とNOシグナルの制御
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 かわり、吉田 卓史、若森 実
2. 発表標題 機械刺激を負荷した歯根膜細胞からのWnt5a産生に関わるシグナル経路の解明
3. 学会等名 第70回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 卓史、若森 実
2. 発表標題 近赤外光刺激によるアクチン重合阻害タンパク質の開発
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 かわり、吉田 卓史、若森 実
2. 発表標題 歯根膜においてCa ²⁺ 依存的に産生されるWnt5aによる神経突起伸長作用の解明
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaori Takahashi, Takashi Yoshida and Minoru Wakamori
2. 発表標題 Elucidation of the regulatory mechanisms of peripheral axon outgrowth by Wnt5a, released from mechanically stimulated rat periodontal ligament cells
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Yoshida, Mengkai Guang, Kaori Takahashi, Takashi Nakamura and Minoru Wakamori
2. 発表標題 Zinc promotes differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells through activation of Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 卓史、高橋 かおり、中村 卓史、若森 実
2. 発表標題 亜鉛によるMC3T3-E1 細胞分化亢進作用におけるカルシウム
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Yoshida, Kaori Takahashi, Minoru Wakamori
2. 発表標題 Wnt5a, released from mechanically stimulated rat periodontal ligament cells enhances the neurite elongation
3. 学会等名 Oral Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 かおり、吉田 卓史、中村 卓史、若森 実
2. 発表標題 機械刺激を受けた歯根膜細胞から産生されるWnt5aによる三叉神経節細胞の分化作用の解明
3. 学会等名 第73回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaori Takahashi, Takashi Yoshida, Takashi Nakamura, Minoru Wakamori
2. 発表標題 Wnt5a, produced by mechanically stimulated periodontal ligament cells, modulates differentiation of trigeminal ganglion cells
3. 学会等名 The 96th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaori Takahashi, Takashi Yoshida, Takashi Nakamura, Minoru Wakamori
2. 発表標題 Morphological changes in peripheral nerves by Wnt5a released from mechanically stimulated PDL cells
3. 学会等名 CAinD Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------